

UNIVERSITY OF HAWAII
LIBRARY

ARCHIV FÜR MIKROBIOLOGIE

ZEITSCHRIFT FÜR DIE ERFORSCHUNG
DER PFLANZLICHEN MIKROORGANISMEN

BEGRÜNDET VON

J. BEHRENS F. BOAS A. RIPPEL

UNTER MITWIRKUNG VON

CHR. BARTHEL-STOCKHOLM · W. BAVENDAMM-DRESDEN-THARANDT · F. BOAS-
MÜNCHEN · H. BORTELS-BERLIN · T. CASTELLI-PERUGIA · W. CUTLER-ROTHAMSTED
V. CZURDA-PRAG · D. FEHÉR-SOPRON · E. B. FRED-MADISON · F. FUHRMANN-GRAZ
C. GORINI-MAILAND · J. GROENEWEGE-KOETARADJA · A. GUILLIERMOND-PARIS
O. HAGEM-BERGEN · A. JANKE-WIEN · S. KRZEMIENIEWSKI-LEMBERG · PH. LASSEUR-
NANCY · E. MELIN-UPPSALA · R. NILSSON-UPPSALA · A. PASCHER-PRAG · B. PEYRONEL-
FLORENZ · O. RAHN-ITHACA · GINO DE ROSSI-PERUGIA · K. SAITO-OSAKA
W. H. SCHOPFER-BERN · W. SCHWARTZ-KARLSRUHE · C. STAPP-BERLIN · H. TAMIYA-
TOKIO · F. TOBLER-DRESDEN · S. WINOGRADSKY-PARIS

HERAUSGEGEBEN VON

A. RIPPEL
GÖTTINGEN

12. BAND. 1. HEFT

MIT 25 TEXTABBILDUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 20. MAI 1941)



BERLIN
VERLAG VON JULIUS SPRINGER
1941

Arch.
Mikrobiol.

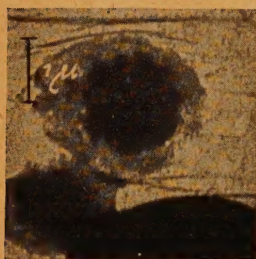
Preis RM 12.60



SIEMENS

ÜBERMIKROSKOP

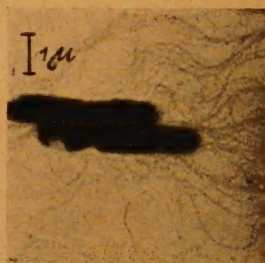
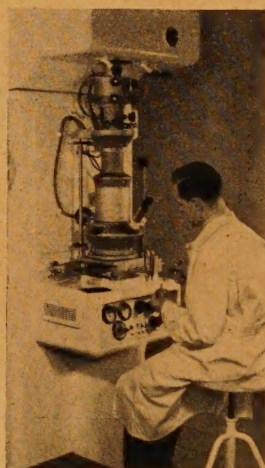
nach Ruska und v. Borries



Blutplättchen



Pockenvirus



Proteusbakterien mit Geißeln



Goldsolreaktion
mit Tabakmosaik-Virusprotein

Für mikroskopische Untersuchungen, die in das Gebiet der bisher „ultravisiblen“ Strukturen fortgesetzt werden sollen, steht heute das Übermikroskop zur Verfügung. Es dient als

FORSCHUNGS-INSTRUMENT

für die Kolloidchemie, Silikatforschung, Farbstoffuntersuchung, Technik der Stäube und Rauche und für die Faserstoffkunde, in der Biologie zur Strukturforschung, Hämatologie, Bakteriologie und Virusforschung. Seine Vorzüge: Auflösungsvermögen 5 bis 10μ . Helle Schirmbilder bei 4000- bis 40000-facher Vergrößerung. Exposition der Platte 1 Sekunde. Strahlspannung bis zu 85 kV, daher gute Objektdurchdringung. Wechsel des Objekts und der Platte je 1 Minute. Hellfeld-, Dunkelfeld- und Stereoaufnahmen. Bequeme Bedienung des Gerätes im Sitzen.

5856-49

(Arbeiten aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen.)

Die Synthese der Knöllchen an den Wurzeln der Erle.

Von

O. v. Plöth.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 12. Dezember 1940.)

Die Bestimmung der systematischen Stellung des in den Wurzelknöllchen der *Erlen* lebenden Endophyten ist seit langem Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchung gewesen, und bis in die neuere Zeit hinein konnte keine Einigkeit darüber erzielt werden (*Ziegenspeck, Borm*). Nach den Untersuchungen von *Krebber* und besonders den eingehenden Beobachtungen von *Schaede* (1933) wurde es aber sehr wahrscheinlich, daß der Symbiont zu den *Actinomyceten* gehört; die Ansicht von der *Actinomyceten*-Natur des Symbionten hat auch *Roberg* (2, 3) übernommen. Ein abschließendes Urteil konnte jedoch solange nicht abgegeben werden, als noch keine Reinkultur des Symbionten vorlag, mit der eine einwandfreie Rückinfektion an steril aufgezogenen Erlen gelungen war.

In der Literatur finden sich eine Reihe von Mitteilungen über angeblich gelungene Reinkulturen des Endophyten (*Peklo, Lieske, Ziegenspeck* und *Borm*). Es handelt sich dabei um die verschiedensten Organismen, die wenig Gemeinsames aufweisen. Mit ihnen wurden z. T. auch Infektionsversuche angestellt, unter denen der bekannteste der, nach den Angaben des Autors, gelungene Versuch von *Peklo* ist, doch ist der Versuch, wie oft betont wurde, nach verschiedenen Richtungen hin nicht einwandfrei. *Lieskes* Infektionsversuche mit Reinkulturen eines von ihm isolierten *Actinomyceten* mißlingen sämtlich, auch dann, wenn gleichzeitig mit *Bact. radicola* geimpft wurde, das nach der Meinung von *Lieske* immer neben dem Strahlenpilz in den Erlenknöllchen vorhanden sein soll (*Lieske*, S. 267). In neuerer Zeit wurden von *Krebber* sehr sorgfältige und umfangreiche Isolierungs- und Impfversuche unternommen, wobei es ihm gelang, zwei *Actinomyceten* zu isolieren, die morphologische Ähnlichkeit mit dem gesuchten Strahlenpilz aufwiesen. Seine Rückimpfungsversuche jedoch führten zu keinem positiven Ergebnis. Es blieb also die Isolierung des Symbionten und die erfolgreiche Rückimpfung einwandfrei aufzogener Erlen als Aufgabe bestehen, die durch die folgenden Ausführungen als gelöst betrachtet werden darf.

Die Isolierung des Endophyten.

Zur Isolierung des Endophyten wurden Knöllchen von *Alnus incana* benutzt. In Abständen von etwa vier Wochen wurden in der Zeit vom August 1938 bis Mai 1939, mit Unterbrechung der Wintermonate Dezember und Januar, in denen der Bodenfrost eine Entnahme verbot, jeweils frische Knöllchen aus den Erlenbeständen des Hainbergs bei Göttingen geholt und untersucht.

Ihre äußere Sterilisierung wurde zunächst auf die verschiedenste Weise versucht. Nach gründlicher mechanischer Säuberung und Trocknung zwischen Fließpapier kamen die Knöllchen für 1 bis 2 Minuten in eine 0,1%ige Sublimatlösung und darauf 2 bis 3 Minuten lang in 70%igen Alkohol, der durch Abflammen entfernt wurde. Häufig wurde das Material auch nach gründlichem Waschen mit Seife $\frac{1}{2}$ Minute in eine 0,01%ige Lösung von Brom gebracht. Nach einer dritten Methode blieben die Knöllchen kurze Zeit in 3%iger Wasserstoffsuperoxydlösung, worauf sie einige Augenblicke in 80%igen Alkohol gelegt wurden.

Alle diese Entkeimungsverfahren zeigten aber keine befriedigenden Ergebnisse. Entweder war die Wirkung der Sterilisationsflüssigkeiten so stark gewesen, daß auch die Symbionten von ihr betroffen wurden, oder sie war derartig unwirksam geblieben, daß die äußere Entkeimung ungenügend verlief. Es kamen mir daher Bedenken, ob es überhaupt eine Methode gibt, durch die alle oder doch nahezu alle den Knöllchen äußerlich anhaftenden Lebewesen abgetötet werden können, ohne den Endophyten zu schädigen. Daher wurde weiterhin auf Sterilisierungsflüssigkeiten überhaupt verzichtet und das Material nach Zerlegung in die Seitenwurzeln nur sehr sorgfältig mit Wasser und Seife gereinigt, mehrere Male mit sterilem destilliertem Wasser in sterilen Gefäßen gewaschen und abgeflammt. Sodann wurde mit einem keimfreien Skalpell die Spitze des Knöllchens abgeschnitten, mit einer feinen sterilen Glasnadel eine Spur des Gewebes der Schnittfläche entnommen und in ein Reagensglas mit flüssig gemachtem Nähragar gebracht, der in eine Petri-Schale ausgegossen wurde. Nach einiger Übung dieses Verfahrens wuchsen auf entsprechenden Nährböden bei den monatlichen Isolierungen fast immer wenige Kolonien eines *Actinomyceten*. Alle diese Isolierungen stimmten nach morphologischem und physiologischem Verhalten untereinander überein und wiesen auch mit dem gesuchten Endophyten Ähnlichkeit auf.

Die Auswahl der Nährböden bereitete anfangs ebenfalls einige Schwierigkeiten.

Zunächst wurde mit verschiedenartigen, teils mit, teils ohne Agar dargebotenen Medien gearbeitet. Von synthetischen Nährböden bekannter Zusammensetzung wurde hauptsächlich der von *Gottheil* angegebene verwandt¹, doch war das Wachstum auf ihm immer spärlich. Ebenso brachte ein Zusatz von 0,5 bis 5 γ Aneurin keinen ersichtlichen Wachstumszusatz. Es entwickelten sich wenige Mikroorganismen verschiedenster Art, unter ihnen auch *Actinomyceten*, die nach dem Mikroskopieren aber ausgeschieden werden mußten, da sie offensichtlich nichts mit dem Erlen-symbionten zu tun hatten.

¹ Pepton Witte 1%, K_2HPO_4 0,1%, $MgSO_4$ 0,03%, NaCl 0,01%, Fe_2Cl_2 0,001%, Agar 1,8%.

Ferner wurden häufig Nährböden unbekannter Zusammensetzung gewählt. Mit Bierwürze, die nach *Lieske* ein üppiges Wachstum von *Actinomycceten* gewährleisten soll, fand niemals eine gute Entwicklung statt. Einige Male wuchs eine Actinomyccetenkultur, das Mycel blieb aber stets kurz und zerfiel frühzeitig; zahlreiche Verdickungen und sonstige Involutionsformen entstanden inmitten der Fäden und an ihren Enden, so daß ein Weiterkultivieren schwer und ein einwandfreier Vergleich mit dem Erlenendophyten nicht möglich war.

Die Impfungen mit Knöllchenmaterial auf sterilen Scheiben von Kartoffeln, Möhren, Zuckerrüben und Kohlrabi verliefen ebenfalls vollständig negativ. Die wenigen auf ihnen gewachsenen *Actinomycceten* und *Bakterien* wichen morphologisch so sehr von dem gesuchten Symbionten ab, daß es unnötig war, sie weiter zu kultivieren.

Ebensowenig brachten Impfungen auf Heuinfus, sowie auf Dekokten von Erlenblättern, Erlenwurzeln und Erdextrakten mit und ohne anorganische Zusätze Erfolg. Sie blieben meistens steril.

Am vorteilhaftesten erwies sich unter dieser Art von Nährböden eine Kombination mit Hefekochsaft als Stickstoffquelle¹. Die *Hefe* enthält wahrscheinlich leicht verwertbare Stickstoffverbindungen, sowie verschiedene Wuchskatalysatoren, die einen günstigen Einfluß auf die Entwicklung der Organismen ausüben. Dennoch wurde dieses Medium später nicht mehr verwendet, weil sich andere gleichwertige Nährböden fanden, deren Herstellung bedeutend einfacher ist.

Fast ausschließlich wurde zur Isolierung zuletzt ein einfacher Fleischwasser-Peptonagar mit 2 % Glycerin als Kohlenstoffquelle benutzt (1,2 % Pepton Witte, 0,8 % Liebig's Fleischextrakt, 0,2 % NaCl). Auch andere Kohlenstoffquellen, wie Dextrose, Lactose und besonders Dextrin, taten gute Dienste, schienen jedoch dem Glycerin etwas unterlegen. Auf „Glycerinagar“ entwickelten sich bei den Impfungen zu den aufeinanderfolgenden Zeitpunkten in den meisten Fällen einige Kolonien eines *Actinomycceten*, der sowohl mit den wie oben angegeben isolierten, als auch mit dem gesuchten Symbionten übereinstimmte und daher weiterkultiviert wurde. Es zeigte sich im Verlauf der Untersuchungen, daß er die Knöllchensynthese hervorzubringen imstande ist, daß er also den gesuchten Endophyten darstellte.

Der p_H -Wert aller Medien wurde z. T. mittels NaOH bzw. H_2SO_4 , in den meisten Fällen aber durch KH_2PO_4 bzw. K_2HPO_4 auf ein p_H von 6 bis 6,5 eingestellt.

Die Sterilisation erfolgte im allgemeinen im Autoklaven. Die Infuse, Dekokte und Extrakte wurden jedoch durch Membranfilter nach *Zsigmondy* von der Membranfiltergesellschaft der *Sartorius-Werke A. G.*, Göttingen, oder durch das Bakterienfilter aus Glas G 5 auf 3 der Firma *Schott und Gen.* filtriert, um eine mögliche Veränderung ihrer Zusammensetzung, die bei der Hitzesterilisation erfolgen konnte, zu vermeiden.

¹ 100 g Bäckerhefe mit 1 Liter Wasser 2 Stunden im Thermostaten bei 25° stehenlassen, dann $\frac{1}{4}$ Stunde bei 2 Atm. Druck sterilisieren und im Kühlraum absetzen lassen. Zusammensetzung des Nährbodens: Mammit 2 %, K_2HPO_4 0,02 %, KH_2PO_4 0,03 %, $MgSO_4$ 0,02 %, NaCl 0,01 %, $CaSO_4$ 0,0005 %, Hefekochsaft 10 ccm, aqu. dest. 90 ccm.

Das Temperaturoptimum lag bei etwa 29° C.

Die Versuche wurden sämtlich unter aeroben Bedingungen angesetzt, da mit großer Wahrscheinlichkeit ein Wachstum unter Sauerstoffzutritt für den Erlensymbionten angenommen werden konnte.

Charakterisierung des isolierten Organismus.

Der isolierte *Actinomyces*, der im folgenden gemäß der schon üblichen Bezeichnung als *Actinomyces alni* bezeichnet wird, ist ein feinfädiger, einzelliger Organismus, der nach Orskow in die von diesem aufgestellte Gruppe I einzureihen ist¹. Sein Myceldurchmesser beträgt 0,8 bis 1 μ . Sein fest zusammenhängendes, glänzendes Mycel verwächst mit dem Nährboden und ist von spröder, fast knorpeliger Beschaffenheit. Es enthält schon in frühen Wachstumsstadien reichlich fett- und wachsartige Stoffe, womit die Eigenschaft der Säurefestigkeit, die *Actinomyces alni* mit wenigen, meist pathogenen Vertretern seiner Art teilt (Davis), zusammenhängen dürfte. Als Oxydationsprodukt von Dextrose und Lactose wird Milchsäure gebildet. Gelatine wird in weitem Umkreis um die Kolonien herum verflüssigt und im Filtrat des verflüssigten Nährbodens sind die letzten Endprodukte der Eiweißzersetzung, Kohlensäure und Ammoniak immer nachweisbar, so daß die Enzyme des Organismus sehr wirksam sein müssen. Chinon wird nicht gebildet. Eine Nährlösung, die Tyrosin als Stickstoffquelle enthält, wird während der Kultur braunrot verfärbt, was mit der Humifizierung zusammenhängen dürfte, doch sind die gefärbten Substanzen in den verschiedensten Lösungsmitteln nicht aufnehmbar. Cellulose wird von *Actinomyces alni* nicht zersetzt, seine Zellmembran enthält kein Chitin und keine Cellulose.

Nach jedesmaliger Isolierung aus den Knöllchen bildete der in Frage kommende Strahlenpilz während vieler Generationen auf flüssigen und festen Nährböden keine Sporen. Später trat dann ohne erkennbare Veränderung der Außenbedingungen und unabhängig vom Nährboden Sporulation ein und die einmal versporteten Kulturen bzw. Kolonien bildeten auch weiterhin Sporen [vgl. v. Plotho (1)]. Die sporenlosen Ausgangsformen waren weit schwerer kultivierbar als die sporulierenden Abkommen und mußten viel häufiger umgeimpft werden. Sie gingen trotzdem nach und nach zugrunde, doch gelang es bei einem im Februar 1939 isolierten Exemplar, den sporenlosen und den sporulierenden Zweig bis heute (Anfang 1941) nebeneinander weiter zu züchten. Nur der sporenbildende Sektor weist den bekannten Erdgeruch der *Actinomyces* auf. Die Sporen sind weiß, rundlich bis oval und werden in großer Zahl gebildet. Sie entstehen durch Einschnürung der Hyphenmembran, wie bei Lehmann und Neumann (Bd. II, S. 786) abgebildet.

¹ Er ist mit den früher [v. Plotho (1)] beschriebenen Stämmen 10 bis 15 identisch. Dort noch weitere Einzelheiten zur Physiologie und Morphologie.

Das Wachstum von *Actinomyces alni* ist bei p_H 6 am besten, was der Wasserstoffionenkonzentration entspricht, die in den Zellen der Wurzelrinde herrscht, in denen sich der Endophyt ausgebreitet hat. Hierauf wird später zurückgekommen.

Die Kultur der Erlen.

Bei der weiten Verbreitung des Erlensymbionten in der Erde ist es für unsere Zwecke nicht angängig, mit im Erdboden gekeimten Pflanzen zu arbeiten, da eine Sicherheit dafür, daß auch sehr kleine Pflanzen nicht bereits infiziert sind, nicht gegeben ist. Die Infektion braucht durchaus nicht immer äußerlich sichtbar zu sein, denn über die Länge des Zeitraums zwischen Infektion und erstem nachweisbaren Auftreten der Knöllchen ist nichts Sicheres bekannt.

Zu den im folgenden beschriebenen Versuchen wurden daher nur Pflanzen herangezogen, die in sterilem Medium gekeimt waren. Samen von *Alnus glutinosa* wurden 24 Stunden in Leitungswasser vorgequollen und in sterilisiertem Sand (1 Stunde bei $120^\circ C$) zum Keimen gebracht. Wenn die Keimlinge eine gewisse Größe erreicht hatten, etwa 3 bis 4 cm hoch waren, wurden sie in N-freie bzw. Kaliumnitrat-haltige Nährlösung überführt. Die N-freie Lösung unterschied sich von der nitrathaltigen v. d. Crone-schen Nährlösung¹ nur dadurch, daß sie an Stelle von 0,1% KNO_3 0,05% KCl enthielt. Die Lösungen wurden mit Leitungswasser angesetzt und nicht sterilisiert, da der Erlensymbiont in Leitungswasser nicht vorhanden ist. Die 300 ccm fassenden Kulturgefäße bestanden aus gewöhnlichem Glas und waren mit einem Korkdeckel verschlossen, der mit einer Durchbohrung für die Belüftung der Kulturen versehen war. Diese wurde durch eine gebogene Glasröhre mit Wattestopfen von der Außenwelt abgeschlossen (Abb. 1). In Abständen von drei bis vier Tagen wurde mittels eines Gebläses atmosphärische Luft durch die Lösung gepreßt, so daß immer reichlich Sauerstoff im Kulturmedium vorhanden war. Diese Maßnahme wurde angewandt, weil sich in Vorversuchen gezeigt hatte, daß nicht „gelüftete“ Kulturen ein bedeutend schlechteres Wachstum zeigten. Ähnliche Angaben finden sich auch in der Literatur. So fand z. B. schon Mazé (1897 und 1899) und neuerdings Pietz, daß bei Leguminosen das Wachstum der Wirtspflanzen sowie der Bakterien bei reichlicher Sauerstoffzufuhr am besten ausfiel. Auch für den mutmaßlich aeroben Symbionten der Erle war anzunehmen, daß eine gute Durchlüftung der Kulturen zu den Bedingungen gehört, die sein Wachstum fördern und somit die Herstellung seiner Reduktionskraft beschleunigen, sowie ihren Grad erhöhen. Auf dieser Reduktionskraft aber beruht, wie angenommen werden muß, die Fähigkeit zur Assimilation des molekularen Stickstoffs.

Da die Kulturgefäße klein waren, wurde die Nährlösung während der ersten Vegetationsperiode alle acht Wochen erneuert, bis im nächsten Frühjahr die herangewachsenen Pflanzen größere Gefäße erhielten, so daß die Erneuerung der Nährlösung weniger oft nötig war.

¹ KNO_3 1%, $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ 0,05%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,05%, $Ca_3(PO_4)_2$ 0,025%, $Fe_3(PO_4)_2$ 0,025%.

Die Reaktion der Lösung wurde immer auf einem p_H -Wert um 6 herum gehalten (Krebber, S. 590), eine Wasserstoffionenkonzentration, die, wie erwähnt, auch für das Wachstum des *Actinomyceten* optimal ist. Die Keimlinge stammten von *Alnus glutinosa*, da sich die Kultur von *Alnus incana* als schwieriger und verlustreicher erwies. Der *Actinomyces* aber war aus den Knöllchen von *Alnus incana* isoliert. Das ist für den Ausfall der Versuche jedoch von keiner Bedeutung, denn nach Roberg (3) sind „die Rhizothamnien der . . . europäischen Erlen von einem und demselben Organismus hervorgerufen und bewohnt“.

Die Kulturen standen im Gewächshaus auf fahrbaren Wagen und wurden bei gutem Wetter ins Freie geschoben.

Am 2. Juni 1939 wurden 55 Pflänzchen aus dem sterilen Sand, in dem sie gekeimt wurden, in Nährlösung übertragen. Je 9 von ihnen dienten als Kontrollpflanzen, d. h. sie wurden dauernd in stickstofffreier bzw. in mit Nitratsstickstoff beschickter Lösung gezogen. Die übrigen 37 N-freien Pflanzen wurden am 6. Juni mit 3 ccm einer Aufschwemmung des isolierten *Actinomyceten* „geimpft“, d. h. 3 ccm Actinomyceten-Aufschwemmung wurde zur Nährlösung hinzugegeben. Dadurch wurde den Pflanzen eine geringe Menge von Stickstoffverbindungen zugeführt, die zu den, übrigens leicht schwankenden, Spuren von Stickstoff, die im Leitungswasser vorhanden sind, hinzukommt. Die folgende Zusammenstellung gibt hierüber eine Übersicht (Analyse auf N nach Kjeldahl):

mg N in 300 ccm Nährlösung	mg N in 3 ccm Actinomyceten-aufschwemmung	mg N insgesamt
0,14	1,39	1,43

Die Pflanze eines jeden Gefäßes erhielt somit in der Anfangszeit ihres Wachstums durch die Symbiontenaufschwemmung etwa 1,4 mg N. Nach 8 Wochen wurden beim ersten Wechsel der Nährlösung noch einmal 3 ccm Symbiontenaufschwemmung hinzugesetzt. Ferner war es möglich, daß in der schwach sauren Lösung geringe Ammoniakmengen aus der Luft festgelegt wurden, so daß sich der Gehalt der Lösung vielleicht um Spuren von Stickstoff anreichern konnte. Auf alle Fälle aber kann die „N-freie“ Nährlösung als sehr arm an Stickstoff angesprochen werden und es war nicht anzunehmen, daß diese Stickstoffspuren eine etwaige Bildung von Knöllchen hemmen oder gar unterdrücken könnten. Eine solche Unterdrückung ist bei Gegenwart von gebundenem Stickstoff bei Leguminosen mehrfach beobachtet worden, doch waren diese Stickstoffmengen ganz erheblich größer (Thornton und Rudorf).

Alle Kulturen entwickelten sich zunächst sehr gut. Nach vierwöchentlicher Kulturdauer machten sich aber bei allen N-frei ernährten Anzeichen von Stickstoffmangel durch auffällige Hellgrünfärbung der

Blätter bemerkbar. Die N-freien, nicht geimpften Pflanzen fingen außerdem an zu kümmern. Nach jedem Wechseln der Nährlösung erholten sie sich ein wenig auf Kosten der Spuren von Stickstoff in der neuen Nährlösung, aber nach und nach gingen alle zugrunde, die meisten bei der Laubentfaltung im nächsten Frühjahr, bei der der Stickstoffmangel besonders deutlich wurde. Keine von ihnen erreichte eine Sproßlänge von mehr als 10 cm.

Die nitratfreien geimpften Kulturen erholten sich dagegen bald, ihre Blattfarbe wurde dunkler, Sproß und Wurzel verlängerten sich



Abb. 1. *Alnus glutinosa* in Wasserkultur. Von links nach rechts: N-frei geimpft, mit Kaliumnitrat, N-frei geimpft, N-frei ungeimpft. Alter der Pflanzen 4 Monate.

beträchtlich. Ende August 1939 wiesen diese Pflanzen eine Sproßlänge von 10,2 bis 15,3 cm auf, manche übertrafen sogar an Sproß- und Blattgröße die nitrathaltigen Kontrollen, wie das auch die Abb. 1 erkennen läßt. An ihr fällt besonders auch die gute Ausbildung des Wurzelgewebes auf, das bei manchen in den engen Gefäßen kaum mehr Platz fand. Doch zeigten die Wurzeln keineswegs die für Stickstoffmangel typische Überverlängerung, sie machten im Gegenteil mit ihren rötlichen Wurzelspitzen (Anthozyan) einen durchaus gesunden Eindruck. Knöllchen waren aber an ihnen nirgends nachzuweisen. Einige Pflanzen mußten während des Sommers 1939 ausgeschieden werden, weil sich in den Kulturgefäßen *Algen* angesammelt hatten, die eventuell eine Stickstoffassimilation hätten herbeiführen können; sonst fielen bei den N-freien geimpften Pflanzen keine Verluste an.

Beträchtliche Verluste entstanden jedoch im nächsten Frühjahr, und zwar gerade unter den kräftigsten N-freien geimpften Pflanzen. Da

das Gewächshaus des Instituts nicht heizbar ist, mußten die Kulturen während des Winters in den Keller gebracht werden und kräftige Pflanzen keimten hier verfrüht aus. Um eine Etiolierung zu vermeiden, welche bei Leguminosen die Knöllchenentwicklung unterdrückt (*Lewis* und *Mc Coy*, *Schweizer*), wurden sie ins Gewächshaus zurückgebracht, hielten aber wegen des andauernd kalten Frühjahrs 1940 diesen Übergang nicht aus. Immerhin überstanden ihn eine Reihe von Kulturen, die sich auch im Sommer 1940 weiterhin gut entwickelten. Am 7. Sep-



Abb. 2. *Alnus glutinosa*.
Knöllchenbildung in Wasserkultur (Alter der Pflanze 15 Monate) bei Impfung mit Reinkultur des Endophyten.
Etwa natürliche Größe.

tember 1940 betrug ihre Sproßlänge 21 bis 28 cm, der Umfang der Stämmchen am Wurzelansatz 2,6 bis 4 cm, der Längsdurchmesser der Blätter 8 bis 9 cm, ihr Querdurchmesser 7 bis 7,8 cm. Nach der kleinen *Ostwaldschen* Farbmeßtafel, Ausgabe A 1939, lag der Farbton der Blätter bei 23 p i, bei anderen etwa bei 24 p i, derjenige von Blättern im Freien gewachsener Erlen bei 23 n l. Acht Pflanzen hatten Knöllchen ausgebildet.

Der genaue Zeitpunkt des ersten Auftretens der Knöllchen an den einzelnen Pflanzen kann nicht angegeben werden. Es ist möglich, daß sie bereits eine Zeitlang an den Wurzeln vorhanden waren, bevor sie bemerkt wurden. Denn die ursprünglich kleinen Knöllchen saßen zudem meist sehr verborgen, und aus verständlichen Gründen sollte ein zu frühzeitiges und häufiges Herausnehmen und Betasten der Wurzeln vermieden werden.

Auf jeden Fall scheint jedoch der Zeitraum zwischen Impfung und Auftreten der Knöllchen ungewöhnlich lang. Vielleicht ist hierfür teilweise der Aufenthalt der Pflanzen

in dem lichtlosen Keller während des Winters verantwortlich zu machen; für Leguminosen jedenfalls ist nachgewiesen (*Schweizer*), daß an im Dunkeln gehaltenen Pflanzen Knöllchenbildung ausbleibt. Außerdem scheint aber die Zeit zwischen Impfung bzw. Infektion und erstem Auftreten der Knöllchen durchaus nicht so begrenzt zu sein, wie *Hiltner* (1903), der von 6 bis 8 Tagen spricht, annahm. Schon *Krepper* fand „weit größere Zwischenräume“ zwischen Infektion und Erscheinen der Rhizothamnen.

Die Knöllchen saßen meistens an der Hauptwurzel dicht unter der Flüssigkeitsoberfläche und waren hier verhältnismäßig groß (Abb. 2).

An den Seitenwurzeln blieben sie erheblich kleiner, manche kamen über sehr kleine rote Verzweigungen oder rote schwielartige Erhebungen mit unregelmäßiger Oberfläche nicht hinaus. Wurde aus ihnen nach der beschriebenen Methode Material entnommen, so wuchsen auf den Platten immer Reinkulturen von *Actinomyces alni* (Abb. 3). Die verhältnismäßig geringe Größe vieler Knöllchen mag darauf zurückzuführen sein, daß die Nährstoffaufnahme und das Nährstoffbedürfnis der Knöllchen wahrscheinlich wesentlich anders sind als bei den nicht metamorphisierten Wurzeln, die Kulturlösung aber abgestellt ist auf die Aufnahme durch diese. Vielleicht liegt hier einer der Gründe, warum so viele Rückimpfungsversuche in synthetischen Nährlösungen mit Reinkulturen von *Actinomyceten* fehlschlagen, während eine Impfung durch eine „reichliche Menge“ (Krebber, S. 590) Knöllchensubstanz, die naturgemäß viele Stoffe unbekannter Art enthielt, die u. U. der Knöllchenentwicklung stark förderlich waren, schon verhältnismäßig früh (Hiltner 1896) zum Ziele führte. Auch in den kleinsten Schwielen fand sich immer das Bläschenstadium, eine Tatsache, auf die bereits Krebber hinwies. Im Herbst 1940 bildeten sich viele kleine Knöllchen an den Seitenwurzeln, die oft dicht nebeneinander saßen. Diese Erscheinung findet ihre Analogie bei den Leguminosen. So schreibt z. B. Kalnins für *Lupinus*-Arten, daß eine reichliche Entwicklung kleiner Knöllchen an den Seitenwurzeln während der Herbstmonate eintrat.

Eine Knöllchenbildung an ungeimpften Pflanzen wurde niemals beobachtet.

Untersuchungen an den infizierten Erlen.

Wie aus den angegebenen Werten hervorgeht, war die Entwicklung der infizierten Erlen eine recht gute; sie kann bei dem nahezu vollständigen Fehlen des Stickstoffs in der Lösung während der ganzen Kulturzeit nur erklärt werden durch die N-Bindung des Symbionten.

Um über die Menge des assimilierten Stickstoffs einen Überblick zu bekommen, wurden Mitte September 1940 zwei, 15 Monate alte, in N-freier Lösung gezogene, geimpfte Pflanzen einer Analyse auf Stick-

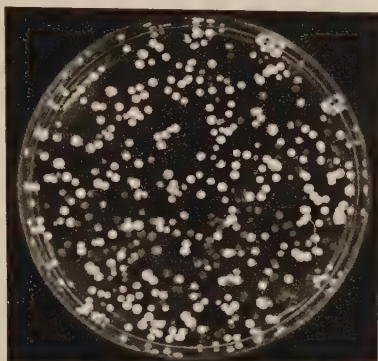


Abb. 3. *Actinomyces alni*. Plattengußkultur aus einem jungen Knöllchen.

stoff nach *Kjeldahl* unterworfen. Die erhaltenen Werte gehen aus der nachstehenden Tabelle hervor¹.

Tabelle I.

Morphologische Entwicklung der Pflanzen	mg N in Sproß und Blättern	mg N in Wurzeln und Knöllchen	mg N insgesamt	mg N in die Kulturflüssigkeit hineingebracht	mg N aus der Luft assimiliert
Gut	45,22	22,06	67,28	3,84 *	63,44
Mäßig	35,14	21,46	56,60	3,84	52,76

* In Actinomycetenaufschwemmung und Nährlösung enthalten.

Die Übersicht läßt erkennen, daß die Menge des assimilierten Stickstoffs mit der Entwicklung der Pflanze parallel geht, was leicht erklärlich ist, da die Entwicklung der Pflanze und die der Knöllchen in Wechselwirkung zueinander stehen. Zum Vergleich der Menge des assimilierten Stickstoffs zu der von anderen stickstoffbindenden Organismen festgelegten seien die Ergebnisse von *Poschenrieder*, *Sammet* und *Fischer* angeführt, die in N-freien Sandkulturen von Sojabohnen bei einer Phosphorgabe von 0.1 % und geringer Kaligabe (0.26 %) einen Stickstoffgewinn von 210 mg für vier Pflanzen, die in einem Topf standen, erhielten. Die von mir bei Erlen gefundenen Werte liegen also je Pflanze etwa in der gleichen Höhe.

Weiter war es interessant, den Stickstoffgehalt der Blätter und des Sprosses in Prozent des Trockengewichtes der entsprechenden Teile für die ohne Stickstoff ernährten Pflanzen zu erfahren und ihn in Vergleich zu setzen mit dem prozentualen Anteil an Stickstoff der mit Kaliumnitrat gewachsenen Pflanzen. Über diese Verhältnisse gibt die Tabelle II Aufschluß.

Tabelle II.

Art der Ernährung	Morphologische Entwicklung der Pflanze	N-Gehalt der Blätter in % des Trockengewichtes	N-Gehalt des Sprosses in % des Trockengewichtes
N-frei	gut	1,39	4,13
„	mäßig	1,31	3,76
Mit KNO_3	—	1,44	4,23

Die Analysen wurden am 24. September ausgeführt, die N-frei ernährten Pflanzen hatten bereits die Blätter teilweise abgeworfen. Auch aus dieser Tabelle geht die Abhängigkeit der Stickstoffbindung von

¹ Da die ungeimpften Pflänzchen frühzeitig zugrunde gegangen waren, so konnten sie leider nicht mehr zum Vergleich herangezogen werden. Da sie aber ganz offenbar, wie auch bei Untersuchungen anderer, an Stickstoffmangel zugrunde gingen, so ist das Ergebnis trotzdem eindeutig.

dem Entwicklungszustand der Pflanze hervor. Im ganzen aber weichen die prozentualen Werte nicht allzuweit voneinander ab, woraus geschlossen werden darf, daß die geimpften Pflanzen den sicher vorhandenen Mangelgehalt an Stickstoff während der ersten Monate ihres Lebens verhältnismäßig gut und schnell aufholen konnten.

In der morphologischen Entwicklung waren allerdings die N-freien geimpften Pflanzen im Durchschnitt etwas hinter den mit Nitrat ernährten zurückgeblieben, eine Erfahrung, die bereits *Krepper* und *Roberg* (1) an ihren Kulturen machten. Dagegen stellte *Virtanen* (1931) die umgekehrte Entwicklung fest, was aber möglicherweise zurückzuführen ist auf die Wirkung der Reaktionsverschiebung in den Kulturgefäßen, die von *Virtanen* nicht beachtet wurde.

Über das Zustandekommen der Infektion bei Erlen wissen wir noch nichts und es kann darüber auch hier nichts Sicheres ausgesagt werden.

Über die Infektion an den Wurzeln der Leguminosen sind in der Literatur einige Beschreibungen erschienen (*I. K. Wilson, Thornton*), die in der Hauptsache darin übereinstimmen, daß die Bakterien in N-freiem Medium an den Wurzelhaaren der Wirtspflanze kleine Kolonien bilden und darauf durch die Zellwand des Haares eintreten. Gleichzeitig vergrößert sich das Wurzelhaar innerhalb kurzer Zeit und bildet zahlreiche Verdickungen und Windungen. Bei *Thornton* findet sich die Photographie eines Wurzelhaares von Luzerne, das auf einer solchen Verdickung eine Kolonie von *Bac. radicicola* trägt. Nach den Ausführungen dieses Autors sind die Deformationen eine notwendige Vorbedingung für die Infektion, und die Hemmung der Veränderungen durch Nitrat ist der Grund für ihr Ausbleiben.

Ganz ähnliche Erscheinungen wurden sechs bis acht Wochen nach der Impfung an den Wurzelhaaren aller geimpften Erlen beobachtet. An den Wurzeln fanden sich zonenförmig verteilt zahlreiche verdickte Haare, die sich endständig und in der Mitte des Haares verknäueln oder spiralig einrollen. Auch bildeten sich zahlreiche Verzweigungen, die sich umeinander winden. Oft verdicken sich die Verzweigungsstellen so stark, daß große kolbenförmige Auftreibungen entstehen. *Thornton* bringt eine Photographie der deformierten Wurzelhaare von Luzerne, die dem Bilde der Erlenwurzelhaare ungemein ähnelt, nur sind diese noch stärker verzweigt und eingerollt.

An den Wurzelhaaren der nitratfreien ungeimpften Erlen wurden diese Erscheinungen niemals beobachtet, bei den mit KNO_3 ernährten Pflanzen kommt es ganz vereinzelt zu kleinen Verknäuelungen, doch bleiben sie stets klein und sind sehr selten.

Außerdem fand sich bei der Untersuchung der Erlenwurzeln an den geimpften Pflanzen eine beträchtliche Vergrößerung der Zahl und Länge der Wurzelhaare, die bei Leguminosen unter dem Einfluß der

Bakterien ebenfalls auftritt. *Thornton* bemerkt in diesem Zusammenhang: „Both the living bacteria and their sterile secretions not only cause deformed growth of the root-hairs, but in addition stimulate an increase in their number and length.“ Die Wurzelhaare der geimpften Erlen waren stets zahlreicher und länger als die der ungeimpften oder der in nitrathaltiger Lösung gewachsenen Pflanzen. Oft waren sie so stark entwickelt, daß das Wurzelgeflecht makroskopisch grau und wie mit einer dünnen Schleimschicht überzogen erschien.

In der zweiten Vegetationsperiode fanden sich die beschriebenen Deformationen nicht, auch die Zahl und Länge der Wurzelhaare war dann durchaus normal.

Wenn diese auffallende Analogie zu den Leguminosen den Eintritt des Erlensymbionten durch die Wand der Wurzelhaare auch wahrscheinlich macht, so gelang es doch niemals, auf einem deformierten Haar eine Kultur des *Actinomyces* zu entdecken oder einen Infektionsfaden festzustellen. Partien deformierter Haare wurden nach *Carnoy* fixiert, auf die übliche Weise in Paraffin eingebettet und 10 μ sowie 5 μ dick geschnitten. Auch in den Schnittserien gelang es nicht, den Symbionten festzustellen.

In zahlreichen Arbeiten berichtete *Virtanen* (1931 und 1933) über eine Diffusion von organischen Stickstoffverbindungen aus den Knöllchen der Leguminosen und teilte weiterhin mit (*Virtanen* und *Saastamoinen*), daß auch aus den Knöllchen lebender Erlen solche Verbindungen in das umgebende Medium austreten sollten, was aber *Bond* sowie *Engel* und *Roberg* für Leguminosen nicht bestätigen konnten. Für Erlen nahm *Roberg* (1) bereits 1934 mit einer größeren Anzahl von Wasserkulturen, die Rhizothamnien besaßen, eine Nachprüfung der Versuche von *Virtanen* und seiner Mitarbeiter vor. Weitere umfangreiche Untersuchungen an Sandkulturen wurden vier Jahre später von *Engel* und *Roberg* veröffentlicht. Alle diese Nachprüfungen hatten ein negatives Ergebnis, in keinem Falle war eine so große Stickstoffzunahme im Kulturmedium nachzuweisen, daß auf einen Austritt von Stickstoffverbindungen geschlossen werden mußte.

Im Verlauf der hier mitgeteilten Untersuchungen wurden nach dieser Richtung hin ebenfalls Versuche angestellt, die in der Tabelle III zusammengefaßt sind. Die Ergebnisse bestätigen durchaus die Mitteilungen der oben genannten deutschen Forscher. In keiner der Analysen (N-Bestimmung nach *Kjeldahl*) konnte ein ins Gewicht fallender Gewinn an Stickstoff festgestellt werden, oft ließ sich überhaupt keine Zunahme feststellen, und es ist insbesondere kein deutlicher Unterschied in der Erhöhung des Stickstoffgehalts der Lösung bei den knöllchentragenden gegenüber der Erhöhung bei den knöllchenfreien Kulturen nachweisbar. Die geringe Zunahme an Stickstoff erklärt sich zwanglos

Tabelle III.

Art der Lösung	Dauer der Bewachung	mg N in 500 cem Lösung	Gewinn an N
Unbewachsen ohne KNO_3	—	0,14	—
„ mit „	—	0,14	—
Mit knöllchenfreien Erlen bewachsen ..	3 Monate	0,29	0,15
„ „ „ „ „	„	0,14	—
„ knöllchentragenden Erlen bewachsen	„	0,29	0,15
„ „ „ „ „	„	0,14	—
„ „ „ „ „	„	0,58	0,44
„ „ „ „ „	„	0,72	0,58
„ „ „ „ „	„	0,14	—

aus den auf S. 6 bereits angeführten Gründen, die auch hier gelten. Es bleibt eine offene Frage, worauf die starken Gegensätze zu den Versuchsergebnissen von *Virtanen* und seinen Mitarbeitern zurückzuführen sind.

Untersuchungen an dem Endophyten.

Durch genaue Beobachtungen wurde nachgewiesen, daß *Actinomyces alni* imstande ist, sich in den stickstofffreien Erlenlösungen zu entwickeln.

Wird eine sterile N-freie Erlenlösung von der angegebenen Zusammensetzung mit Sporen des Actinomyceten beimpft, mehrere Tage bei 23° C gehalten und dann zentrifugiert, so enthält der Bodensatz junge Hyphen des Strahlenpilzes.

Ebenso entwickelt sich der Actinomycet auch dann in der Erlenlösung, wenn gleichzeitig eine junge Erle in ihr wächst. Wenn eine 8 Wochen zuvor mit Sporen beimpfte, mit einer Erle bewachsene N-freie Lösung zentrifugiert wird, so finden sich im Bodensatz die Hyphen des Strahlenpilzes.

Allerdings ist das Wachstum in allen Fällen so schwach, daß es zweifelhaft erscheinen kann, ob die Auskeimung der Sporen und die Entwicklung der Mycelien auf der Bindung molekularen Stickstoffs beruht, oder ob nicht vielmehr die Ausnutzung der in der Kultur enthaltenen oder der in sie aus der Luft eingedrungenen Spuren von gebundenem Stickstoff in Frage kommt. Geringe Zusätze von Nitrat erhöhen das Wachstum erheblich, auch Nitrite werden ausgenutzt [v. *Plotto* (1)].

Dagegen ist es sehr wahrscheinlich, daß das Mycel des Strahlenpilzes innerhalb der Erlenwurzeln die Stickstoffbindung vollzieht. Außer den Hyphen kämen hierfür eventuell noch die auffälligsten Gebilde in den Knöllchen, die sogenannten Bläschen in Betracht. Diese haben begreiflicherweise seit langem die Aufmerksamkeit der Beobachter auf sich gezogen und die verschiedensten Deutungen erfahren

(Hiltner 1903, Borm). Jetzt hält man sie wohl allgemein für Involutionsformen. Sie stehen mit den Hyphen in Verbindung, wie deutlich beobachtet werden konnte, besitzen eine Membran und sind nach Gram färbbar. Die Färbbarkeit haftet auch in ihnen ebenso wie in den Fäden an bestimmten Körperchen, die in verschiedener Menge und Verteilung in ihnen niedergelegt sind. Bei der Nuclealreaktion nach Feulgen zeigen die Bläschen schwache diffuse „Färbung“. Ihr Plasma erscheint jedoch eigentümlich granuliert, auch in ganz jungen Bläschen, und weicht dadurch von dem homogen reagierenden Plasma der Fäden deutlich ab [v. Plotho (2)].

Dieses Ergebnis legt die Annahme nahe, daß sich der Bläscheninhalt nicht mehr in lebensfähigem Zustand befindet. Zur Prüfung dieser Frage wurden mit dem Mikromanipulator 35 Bläschen aus jungen Erlenknöllchen isoliert und auf Glycerinagar gebracht. Nicht ein einziges Bläschen entwickelte sich. Dieses Ergebnis ist als Analogie zu der Isolierung von Bakteroiden aus den Knöllchen von Leguminosen anzusehen (Almon). In den Bläschen der Erlen haben wir daher Formen zu sehen, die wohl schon jenseits von Symbiose und Stickstoffbindung liegen. Die in ihnen angehäuften wertvollen Eiweißstoffe kommen der Wirtspflanze zugute, entweder dadurch, daß eine Autolyse der Bläschen einsetzt, oder ihre Verdauung durch die Pflanze stattfindet. Schaefer (1933) tritt auf Grund cytologischer Beobachtungen für eine Verdauung ein. Als eigentlicher Träger der Stickstoffbindung aber dürfte das normale Mycel des Actinomyceten anzusehen sein. Auch bei anderen stickstoffbindenden Organismen sind es die normalen Formen (*Bac. amylobacter* und *Azotobacter*), die die Assimilation durchführen. Vielleicht ist das Mycel auch außerhalb der Knöllchen zu einer gewissen Stickstoffbindung befähigt. Auf diese Weise wäre es möglich, die ausgezeichnete Entwicklung der N-freien geimpften Erlen während der ersten Vegetationsperiode zu erklären, die derjenigen der mit Nitrastickstoff ernährten Pflanzen nur wenig nachstand, obgleich an den Wurzeln keine Knöllchen zu entdecken waren.

Die starke Verzweigung und Anhäufung des Mycels an bestimmten Stellen der Wurzel, die mit Wucherungen des Pflanzengewebes einhergeht und als Knöllchenbildung in Erscheinung tritt, steht auch bei der Erle, allen Beobachtungen zufolge, in Wechselbeziehungen zu der Menge der Kohlenhydrate, die von der Pflanze an diesen Stellen angehäuft werden. In den den Rhizothamnen benachbarten Rindenschichten der nicht metamorphisierten Wurzeln, sowie in den Knöllchen selbst, wurde eine starke Anhäufung von Kohlenhydraten in Form von Stärke stets beobachtet. Die infizierten Wurzelrindenzellen enthalten manchmal wenige kleine Stärkekörnchen, in den weitaus meisten Fällen aber findet sich in ihnen keine Stärke. In den benachbarten, nicht

infizierten Rindenzellen ist sie dagegen immer in reichlicher Menge vorhanden. Schon *Shibata* beobachtete bei *Myrica rubra* in den ebenfalls von einem *Actinomyces* hervorgerufenen Knöllchen eine Hydrolyse der Stärkekörner, was von *Schaepe* (1938) für *Myrica Gale* bestätigt wurde. Daß diese Umsetzung des Kohlenhydrats einen entscheidenden Teilfaktor zur Befähigung der Stickstoffassimilation darstellt, wurde für *Bac. radiculicola* bereits von *Frank* vermutet und durch Untersuchungen von *Rippel* und *Poschenrieder*, *Rippel* und *Krause* und anderen erhärtet. Danach erfordert die Zerreißung des Stickstoffmoleküls in seine beiden Atome einen beträchtlichen Energieaufwand, der nicht bestritten werden kann durch die, zuerst von *Linhardt* vermutete, exothermisch verlaufende Reduktion des Stickstoffatoms zu NH_3 . Außerdem verlangt die Wasserstoffanlieferung sowie die Herstellung der Reaktionsfähigkeit des Stickstoffs aller Wahrscheinlichkeit nach einen weiteren energetischen Aufwand, zu dessen Bestreitung die Endophyten die Kohlenhydratanlagerungen heranziehen werden.

Die gleichen Zusammenhänge liegen bei dem Symbionten der *Alnus*-Arten vor. Hier gewinnt der Zusammenhang von Stärkezufuhr und Stickstoffassimilation sogar noch größere Wahrscheinlichkeit durch die erwähnte Fähigkeit des Organismus zur Bildung von Milchsäure [*v. Plotho* (1)], denn dieser Säure ist im Hinblick auf den oxydativen Abbau der Kohlenhydrate erhebliche Bedeutung zuzuschreiben (*Schneider*). Mit dem Chemismus dieses Abbaues dürften die im Symbionten erreichbaren Oxydations-Reduktionspotentiale zusammenhängen, die das Symbiontengewebe befähigen, eine mehr oder weniger hohe Reduktionskraft zu entwickeln.

Jedenfalls dürfen wir als Voraussetzung der Stickstoffbindung auch bei Erlen bestimmte Oxydo-Reduktionspotentiale annehmen. Mit den Oxydationsverhältnissen hängt aber die im Knöllchen vorhandene Acidität eng zusammen. Es wurde daher versucht, die in diesen Gebilden herrschende Wasserstoffionenkonzentration zu ermitteln, wozu die Methode von *Pietz* benutzt wurde. Schnitte junger Erlenknöllchen wurden in die von *Clark* und *Lubs* angegebenen Farb-indikatoren gelegt und nach einer Einwirkungszeit von höchstens 30 Minuten in ihnen untersucht. Die Ergebnisse sind aus der nachstehenden Tabelle IV zu ersehen. Wie daraus hervorgeht, liegt die Acidität der nicht infizierten Wurzelrindenzellen zwischen einem p_H von 3,6 und 5,2, etwa bei 4,4, während die infizierten Rindenzellen ein p_H von ungefähr 6 aufweisen. Es besteht also ein beträchtlicher Unterschied in der Wasserstoffionenkonzentration zwischen den normalen Rindenzellen der Wurzel und den von dem Endophyten infizierten. Damit ist auch für den Erlensymbionten ein erster Schritt zur Feststellung der Lebensbedingungen im spezifischen Milieu getan

Tabelle IV.

Indikator	Umschlagsgebiet	Farbe der nicht infizierten Wurzelrindenzellen	Farbe der infizierten Knöllchenzellen
Bromphenolblau ...	$p_H > 4$ tiefblau $p_H < 3,6$ gelb	grünblau	tiefblau
Methylrot	$p_H > 5,7$ gelb $p_H < 5,2$ tiefrot	tiefrot	gelb
Bromkresolpurpur ..	$p_H > 6,2$ purpurn $p_H < 5,8$ gelb	gelb	gelbrot
Bromthymolblau ..	$p_H > 7$ dunkelblau $p_H < 6,5$ gelb	gelb	gelb

(wie für die Leguminosen nach *Pietz*), wobei die Frage offen bleibt, auf welche Weise die für das Wachstum des Actinomyceten günstige Wasserstoffionenkonzentration in den infizierten Zellen der Wurzelrindenschicht entsteht.

Pietz sieht in dem im jungen Knöllchen von *Vicia faba* vorliegenden roten Farbstoff den „roten Körper“ *Rapers*, weil nach seinen Untersuchungen im Stickstoffstrom der rote Farbstoff verschwindet und durch Sauerstoffzufuhr wieder hergestellt werden kann. Da frische Schnittflächen von Erlenwurzeln und Erlenknöllchen weiß sind und an der Luft eine rote Färbung annehmen, wurden gerötete Schnitte von Wurzeln und Knöllchen längere Zeit in einen Stickstoffstrom gebracht. Es konnte jedoch weder bei den Wurzel-, noch bei den Knöllchenschnitten eine Bleichung der Schnittflächen festgestellt werden, so daß ein Unterschied im Oxydationszustand zwischen Wurzel- und Knöllchengewebe auf diese Weise nicht nachweisbar war. Nach dieser Richtung hin wären weitere Untersuchungen sehr zu begrüßen.



Abb. 4. *Alnus glutinosa*.
Endophyt in den Markstrahl-
zellen des Gefäßteiles der
Wurzel. Vergr. 900.

In ausgezeichneten cytologischen Untersuchungen hat *Schaede* (1933) in alten, langsam gewachsenen Knöllchen von *Alnus glutinosa* neben den stets auftretenden Bläschenstäbchen- bis kugelförmige Gebilde beschrieben und abgebildet, die er als Bakteroiden bezeichnet und von denen er annimmt, daß sie keine selbständigen Wesen, sondern einen besonderen Entwicklungszustand des Endophyten darstellen. Er spricht den Bakteroiden besondere Aufgaben bei der Verbreitung des Strahlenpilzes zu. In jungen Knöllchen von

Alnus glutinosa, sowie in anderen Erlenarten konnte *Schaede* sie aber nicht nachweisen. In den in meinen Wasserkulturen entstandenen Knöllchen von *Alnus glutinosa* waren sie nie vorhanden.

Dagegen gelang es auf andere Weise, über die Verbreitung des Strahlenpilzes in den Wurzeln Aufklärung zu gewinnen.

Wie erwähnt, bildeten sich im Herbst 1940 an den Seitenwurzeln der infizierten Erlen auffallend viele kleine Knöllchen, die dicht nebeneinander saßen. Von solchen Seitenwurzeln wurden mehrere Wurzelteile, die zwischen jungen Knöllchen, welche 0,5 bis 0,7 cm voneinander entfernt lagen, herausgeschnitten, nach *Carnoy* fixiert, auf die übliche Weise in Paraffin überführt, 5 μ dick geschnitten und mit Jodgrün gefärbt (0,15 g Jodgrün, 0,05 g Fuchsin, 100 cem aqu. dest.). Einige Schnitte wurden nach *Gram* und mit Orseillin BB nach *Alcorn* und *Yeager* gefärbt. Die Untersuchung erfolgte in Canada-balsam. In diesen Schnitten konnte der Actinomycet in den Rindenzellen der Wurzeln sowie in den Markstrahlzellen des Gefäßteiles nachgewiesen werden, was die Mikrophotographie der Abb. 4 erkennen läßt. In diesen Zellen wächst der Endophyt also offenbar weiter. Möglicherweise gelangt er auch in die Leitungsbahnen der Wurzeln, in denen er auch auf mechanische Weise transportiert werden könnte. Auch in Zellen der Anlagen der Seitenwurzeln konnte ich den Actinomyceten nachweisen.

Zusammenfassung.

Aus den Knöllchen von *Alnus incana* wurde der Erreger der Wurzelwucherungen isoliert und mit ihm steril gekeimte, in N-freier Nährlösung wachsende, Erlen geimpft. An ihnen entstanden Knöllchen.

Die Menge des aus der Luft assimilierten Stickstoffs sowie der Gehalt an Stickstoff in Sproß und Blättern in % des Trockengewichts wurden bestimmt.

Aus den Knöllchen von Wasserkulturen der Erlen traten keine organischen Stickstoffverbindungen aus.

In den Knöllchen sowie den benachbarten Wurzelzellen fanden sich reichliche Kohlenhydratablagerungen, die zur Stickstoffassimilation in Beziehung stehen.

Bakteroiden waren nicht vorhanden. Der Endophyt verbreitet sich durch Weiterwachsen in den Wurzelzellen der Wirtspflanze.

Mit dem Mikromanipulator auf Nähragar gebrachte Bläschen entwickelten sich nicht.

Für die Unterstützung bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit sage ich dem Reichsforschungsrat, Fachsparte Landbauwissenschaft und allgemeine Biologie, für die Anregung zum Thema Herrn Prof. Dr. A. Rippel meinen besten Dank.

Literatur.

Alcorn, G. D., u. *C. C. Yeager*, Stain Technol. **12**, 157, 1937. — *Almon, L.*, Centralbl. f. Bakt. II, **87**, 289, 1933. — *Bond, G.*, Ann. of Bot. N. S. **2**, 61, 1938. — *Borm, L.*, Bot. Arch. **31**, 441, 1931. — *Davis, D., J.* of infect. Dis.

- 14, 144, 1914. — *Engel, H.*, u. *M. Roberg*, Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **56**, 337, 1938. — *Frank, B.*, Landw. Jahrb. **21**, 1, 1892. — *Gottheil, R.*, Centralbl. f. Bakt. II, **7**, 432, 1901. — *Hiltner, L.*, Landw. Versuchsst. **46**, 153, 1896. — *Derselbe*, Naturwiss. Zeitschr. f. Land- u. Forstwiss. **11**, 17, 1903. — *Kalnins, A.*, Acta Univ. Latviensis Ser. IV, **2**, 41, 1938; Litauisch, engl. Zusammenfassung, S. 64. — *Krebber, O.*, diese Zeitschr. **3**, 588, 1932. — *Lehmann-Neumann*, Bd. II. München, J. F. Lehmann, 1927. — *Lewis, K. H.*, a. *E. McCoy*, Bot. Gaz. **95**, 316, 1933/34. — *Lieske, R.*, Morphologie und Biologie der Strahlenpilze (Actinomyceten). Leipzig, 1921. — *Linhardt, H. I.*, J. of Gen. Physiol. **3**, 1, 1920. — *Mazé, M.*, Ann. Inst. Pasteur **11**, 44, 1897. — *Derselbe*, Ann. Inst. Pasteur **13**, 145, 1899. — *Peklo, I.*, Centralbl. f. Bakt. II, **27**, 451, 1910. — *Pietz, I.*, ebenda II, **99**, 1, 1938/39. — *v. Plotho, O.*, diese Zeitschr. **11**, 33, 1940. — *Derselbe*, diese Zeitschr. **11**, 285, 1940. — *Poschenrieder, H.*, *K. Sammet* u. *R. Fischer*, Centralbl. f. Bakt. II, **102**, 389, 1940. — *Raper, H. S.*, Fermentforsch. **9** (neue Folge 2), 206, 1928. — *Derselbe*, Ergebn. d. Enzymforsch. **1**, 217, 1932. — *Rippel, A.*, Forschungsdienst Sonderheft **6**, 1937. — *Derselbe* u. *W. Krause*, diese Zeitschr. **5**, 14, 1934. — *Derselbe* u. *H. Poschenrieder*, J. f. Landwirtschaft **76**, 206, 1928. — *Roberg, M.*, Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **52**, 54, 1934. — *Derselbe*, Jahrb. f. wiss. Bot. **79**, 427, 1934. — *Derselbe*, ebenda **86**, 344, 1938. — *Schaepe, R.*, Planta **19**, 389, 1933. — *Derselbe*, ebenda **29**, 32, 1938. — *Schneider, A.*, ebenda **29**, 747, 1939. — *Schweizer, I.*, Verh. schweiz. naturf. Ges. **113**, 376, 1932. — *Shibata, K.*, Jahrb. f. Bot. **37**, 669, 1902. — *Thornton, H. G.*, a. *E. Rudorf*, Proc. London Soc. Ser. B **120**, 240, 1936. — *Derselbe*, ebenda **119**, 474, 1936. — *Virtanen, A. I.*, Zeitschr. f. Pflanzenernährung, Düng. u. Bodenkde. A **21**, 57, 1931. — *Derselbe*, Ann. Acad. Sci. Fennicae **36**, 1, 1933. — *Derselbe* u. *S. Saastamoinen*, Biochem. Zeitschr. **284**, 72, 1936. — *Wilson, J. K.*, Phytopathology **21**, 1083, 1931. — *Ziegenspeck, H.*, Ber. d. 43. Generalvers. d. Deutsch. bot. Ges. **50**, 1929.

(Aus dem Botanischen Institut Göteborg.)

Das Wachstum einiger Pilze aus Holzschliff bei verschiedener Temperatur.

Von

E. Rennerfelt.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 4. Januar 1941.)

Es gibt in feuchtem Holzschliff eine reiche Pilzflora, die sowohl systematisch als ökologisch verschiedene Gruppen beherbergt. Es werden *Hefe-ähnliche Pilze* (*Torulopsidaceen*) angetroffen, sowie *Bläuepilze*, von denen die meisten den *Fungi imperfecti* angehören; weiterhin werden *Schimmelpilze* und *Fäulnispilze* gefunden. Die Zusammensetzung dieser Mikroflora in dem frischen Holzschliff ist in hohem Maße von den Herstellungsverhältnissen abhängig. Ein Faktor von großer Bedeutung ist dabei die Temperatur in dem zirkulierenden System. Schleifereien von wesentlich ungleichen Systemtemperaturen besitzen auch Mikrofloren, die sowohl in quantitativer als in qualitativer Beziehung voneinander beträchtlich abweichen. Wenn auch andere Faktoren als die Temperatur hierzu beitragen, muß dieser doch eine große Bedeutung zugeschrieben werden. Es entbehrt deshalb nicht eines gewissen Interesses, die Entwicklung einiger aus Holzschliff isolierten Pilze bei verschiedener Temperatur näher zu untersuchen. Insgesamt wurden folgende 14 Arten untersucht:

1. *Rhodotorula glutinis* (Fres.) Harrison. — 2. *Rhodotorula gracilis* Rennerfelt. — 3. *Torulopsis candida* (Saito) Lodder. 4. *Torulopsis Molischiana* (Zikes) Lodder. — 5. *Geotrichum candidum* Link. — 6. *Phialophora fastigiata* (Lagerb. et Mel.) Con. — 7. *Phoma lignicola* Rennerfelt. — 8. *Pullularia pullulans* (de Bary et Löw) Berkh. — 9. *Trichosporium heteromorphum* Nannf. — 10. *Aspergillus fumigatus* Fres. — 11. *Penicillium rugulosum* Thom. — 12. *Pholiota mutabilis* (Schaeff.) Quel. — 13. *Polyporus hirsutus* (Wulf) Fr. — 14. *Polystictus versicolor* (L) Fr.

Von diesen Pilzen gehören die vier ersten den *Torulopsidaceen* an, sie vermehren sich also durch Knospung, ganz wie die Hefen; *Geotrichum candidum* ist ein hyaliner Hyphomycet. Nr. 6 bis 9 sind *Bläuepilze*, von denen *Phoma lignicola* zu den *Sphaeropsideae*, die anderen den *Dematiaceae* angehören. Nr. 10 und 11 sind Vertreter der *Schimmelpilze*, die drei letzten sind *Fäulnispilze*. Die Kultur von *Pholiota muta-*

bilis hat mir Herr Universitätsstipendiat *Robak*, Oslo, freundlichst übersandt. Der Pilz ist aus Holzschliff isoliert, eine nähere Beschreibung ist bei *Robak* (1933) zu finden. Die zwei letztgenannten Pilze wurden von Fruchtkörpern aus dem Botanischen Garten in Göteborg isoliert. Bei künstlicher Infektion auf Holzschliff wachsen diese Mycelien ziemlich schnell.

Methodik.

Die Pilze wurden in Erlenmeyerkolben von 100 ccm gezüchtet, jeder Kolben enthielt 25 ccm Nahrungslösung. Das Salzgemisch war nach *Boas* (1935) hergestellt und erfüllt alle Ansprüche der Pilze an anorganischer Nahrung, auch an solchen Metallen, die sie u. U. nur in sehr kleinen Mengen brauchen. Als Kohlenstoffquelle erhielten die Pilze 2% Saccharose. Außerdem wurde je Kolben 25 mg Hefeextrakt (Cenovis) hinzugefügt, um den Bedarf an Vitaminen zu sichern. Die Kolben wurden 30 Minuten bei 1,5 Atm. sterilisiert.

Nach Abkühlung wurden die Kolben mit je 1 ccm einer Sporensuspension beimpft, die gemäß Zählung in einer Zählkammer je ccm 40000 Sporen enthielt. Die Anzahl Sporen je ccm Flüssigkeit belief sich demnach auf etwa 1600. Die Sporenanzahl wurde außerdem durch Aussaat auf Malzagarplatten bestimmt. Hierfür wurde aus einem besonderen Kolben 1 ccm genommen, und nach Verdünnung 1:10 wurde die Aussaat mit 1 ccm gemacht. Theoretisch hätten also je Schale etwa 160 Kolonien auswachsen müssen. Diese Anzahl wurde jedoch selten erreicht, meistens keimten weniger Sporen aus, in einigen Fällen ganz beträchtlich weniger. Bei Bestimmung der Keimzahl mittels Aussaat werden in der Regel niedrigere Werte erhalten als bei Zählung. Viele Faktoren dürften hierzu beitragen: Verdünnungsfehler, die Tatsache, daß die Keimfähigkeit nicht immer 100%ig ist, und endlich der Umstand, daß zwei keimfähige Sporen so dicht beieinander liegen können, daß sie beim Zählen nur als eine Kolonie gerechnet werden. Die gleiche Erfahrung liegt in der Bakteriologie vor (*Muntsch*, 1930, *Wohlfel*, 1933).

Die Kolben mit Fäulnispilzen wurden mit Mycelstücken, etwa 3×3 mm, aus Agar geschnitten, beimpft.

Nach Beimpfung wurden die Kolben bei folgenden Temperaturen bebrütet: 5, 12, 17, 22, 27, 32, 37 und 42° C. Vier Parallelen wurden benutzt. Die Kolben bei 5° standen in einem Kühlschrank, die Temperaturen 12 und 17° wurden mittels Wasserkühlung erhalten, für die übrigen wurden Thermostaten benutzt. Bei 5 bis 17° schwankte die Temperatur etwa $\pm 1^\circ$, bei den übrigen etwa $\pm 0,5^\circ$.

Nach 10 Tagen wurde der Versuch beendet. Als Maß für das Wachstum wurde die gebildete Menge Trockensubstanz ermittelt. Betreffs der *Torulop-sidaceae* wurde eine gewisse Menge der Pilzsuspension, in der Regel 15 ccm aus jedem Kolben, in einen Jenaer Glasfildertiegel Nr. G 3 oder G 4 abfiltriert und darin nach Trocknung bei 100° gewogen. Die übrigen Pilze wuchsen mit einem mehr oder minder kräftigen Mycel. Dieses wurde mit einer Pinzette herausgeholt, in destilliertem Wasser sorgfältig abgespült und nach Trocknung bei 100° gewogen. Zurückbleibende Mycelfragmente, wie auch Sporen, die in einigen Fällen reichlich gebildet wurden, wurden in Fildertiegeln aufgehoben.

Mit den Torulopsidaceen und einigen der Bläuepilze wurden noch einige Bestimmungen gemacht. Teils wurde die Anzahl der Zellen je ccm Flüssigkeit in einer Zählkammer bestimmt, teils wurde durch Aussaat auf Agar untersucht, wie viele von diesen Zellen lebendig waren. Hierfür war es, wegen der massenhaften Vermehrung, oft notwendig, die Proben auf das 1000- oder 10000-fache zu verdünnen, um die Zählung der auskeimenden Sporen unternehmen zu können. Die Proben für die Zählkammer wurden aus einer Mischungsprobe der vier Parallelen genommen, und 2×36 Vierecke wurden gezählt. Die vier Aussaaten auf Agar wurden ebenfalls mit einer Mischprobe unternommen. Da im Laufe des Versuchs Wasser aus den Kolben verdunstete, um so mehr je höher die Temperatur war, wurde am Ende des Versuchs diese Volumenabnahme gemessen. Die gefundene Anzahl Zellen wurde dann auf das ursprüngliche Volumen, 26 ccm (25 ccm Nahrungslösung und 1 ccm Impfmateriale), umgerechnet. Die gleiche Korrektur wurde natürlich auch bei dem Wiegen gemacht.

Ein Teil der Pilze zeigte bei den Extremtemperaturen kein Wachstum. Mittels Aussaat auf Agar wurde in solchen Fällen untersucht, ob die Pilzsporen bzw. das Mycel noch lebendig waren.

V Versuchsergebnisse.

Rhodotorula glutinis. Dieser weit verbreitete Pilz hat ein recht enges Temperaturgebiet. Gemäß Harrison (1928) wächst er bei 25° am besten und wächst bei 37° nur spärlich. Der hier benutzte Stamm zeigt optimale Bildung sowohl von Trockensubstanz als auch von Zellen bei 22° (vgl. Tabelle I). Oberhalb dieser Temperatur nimmt die Produktion schnell ab, bei 27° beträgt sie nur etwas mehr als ein Fünftel des Optimalwertes, und bei 32° ist sie sehr geringfügig. Bei 37 und 42° war die Zellenanzahl so gering, daß kein Wiegen möglich war. Bei 12 und 17° war die Zellenanzahl recht groß, bei 5° dagegen sehr klein und das Wachstum sehr spärlich.

Tabelle I. Das Wachstum von *Rhodotorula glutinis* bei verschiedener Temperatur.

Temperatur ° C	Zellenanzahl je ccm in Millionen			% lebend	Gewicht je Kolben mg
	Zählung		Aussaat		
	Individuen	Kolonien			
5	0,05	0,05	0,003	5,8	+ **
12	26,8	14,0	24,1	90,0	17,6 ± 2,1
17	93,3	45,2	31,0	33,3	47,1 ± 3,5
22	158,3 *	62,3	17,7	11,2	75,0 ± 5,6
27	28,7	13,3	1,32	4,6	16,9 ± 2,2
32	0,61	0,61	0,006	1,0	0,4
37	0,19	0,19	0,001	0,5	+
42	—	—	0,0004	—	+

* Fett gedruckte Ziffern geben die Optimumwerte an. — ** + = nicht wägbare, die Zellen lebend; — = nicht wägbare, keine lebende Zellen in den Kolben.

Durch Aussaat auf Agar konnte festgestellt werden, daß die größte Anzahl lebender Zellen in den Kolben bei 17° vorhanden war, also nicht bei der gleichen Temperatur, bei der die Zellenanzahl absolut am größten war. Mit zunehmender Temperatur nahm die Anzahl lebender Zellen immer mehr ab, bei 27° waren von 28,7 Millionen Zellen nur 1,32 Millionen lebend, bei noch höheren Temperaturen, wie auch bei 5°, war die Anzahl sehr gering.

Wie vorher gesagt, ist eine exakte Bestimmung der Keimzahl schwer ausführbar. Bei Pilzen, wie den *Torulopsidaceen*, die sich durch Knospung vermehren, werden die Schwierigkeiten dadurch noch größer, daß die Zellen oft zu zwei oder zu drei zusammenhängen. Bei der Aussaat kommt es vor, daß eine solche Kolonie in zwei oder drei Zellen zerfällt, die jede in der Platte zu einer Kolonie auswächst. Wenn aber die Zellen nicht ganz reif sind, können sie auch bei der Aussaat zusammenhängen und wachsen nur zu einer Kolonie aus. Bei der Zählung habe ich eine Zellenkolonie als zwei Individuen gelten lassen, wenn die beiden Zellen deutlich voneinander getrennt waren. Eine kleine oder nur bis zur Hälfte ausgebildete Knospe habe ich nicht gezählt. Ein Vergleich zwischen den Spalten „Kolonien“ und „Aussaat“ in Tabelle I zeigt, daß bei 12° die Aussaat höhere Zahlen ergeben hat: offenbar waren in diesem Falle die Zellen in den Kolonien so locker aneinandergefügt, daß sie bei der für die Aussaat notwendigen Verdünnung entzweitgegangen waren. In dieser Neigung zur Koloniebildung liegt gewissermaßen eine Fehlerquelle, die bei der Optimumtemperatur, wo die lebhafteste Knospung vorkommt, und die Zellen demzufolge öfter zu zwei oder zu drei zusammenhängen (vgl. das Verhältnis zwischen den Spalten „Individuen“ und „Kolonien“ in den Tabellen), am größten ist. Je näher man den Extremtemperaturen kommt, desto spärlicher wird die Knospung, und die Zahlen für „Individuen“ und „Kolonien“ werden dann annähernd die gleichen. Bei Berechnung des Prozentes lebender Zellen bin ich durchwegs von der Zahl der „Individuen“ ausgegangen.

Der höchste prozentische Anteil an lebenden Zellen lag bei *Rhodotorula glutinis* bei einer noch niedrigeren Temperatur als die größte absolute Anzahl lebender Zellen. Bei 12° waren 90 % der Zellen lebend, bei zunehmender Temperatur wurde der Anteil an lebenden Zellen immer kleiner (vgl. Tabelle I). Bei 22°, wo die Zellenproduktion optimal war, waren am Ende des Versuchs nur 11,2 % der Zellen lebend. Bei 32 und 37° und ebenso bei 5°, wo die Individuenanzahl schon an und für sich sehr klein war, muß auch die Lebensdauer der Zellen sehr kurz sein, nur wenige Prozente der Zellen waren lebend.

Rhodotorula gracilis. Dieser Pilz hat ein Wachstumsgebiet, daß sich über ein größeres Temperaturintervall erstreckt (siehe Tabelle II und Abb. 1). Die größte Zellenanzahl sowie die höchste Menge

Tabelle II. Das Wachstum von *Rhodotorula gracilis* bei verschiedener Temperatur.

Temperatur ° C	Zellenanzahl je ccm in Millionen			% lebend	Gewicht je Kolben mg
	Zählung		Aussaat		
	Individuen	Kolonien			
5	1,0	0,88	0,44	44,0	0,15
12	24,7	13,2	12,8	51,8	3,2 ± 0,6
17	52,5	39,6	23,8	45,4	7,3 ± 0,8
22	103	71,2	13,6	13,2	15,5 ± 1,1
27	115	74,0	9,44	8,2	21,4 ± 1,3
32	106	72,2	4,41	4,2	21,0 ± 1,5
37	24,6	20,1	1,5	6,1	5,0 ± 0,6
42	0,26	0,24	0,01	3,8	+

Trockensubstanz wurde bei 27° erhalten. Mit *Rh. glutinis* verglichen ist jedoch die Menge der gebildeten Trockensubstanz erheblich geringer. Das Wachstum ist zwischen 12 und 37° recht gut, *Rh. gracilis* kann also bei etwa 5 bis 10° höherer Temperatur als *Rh. glutinis* noch wachsen, was ich schon früher festgestellt habe (Rennerfelt, 1938).

Die meisten lebenden Zellen wurden bei 17° gefunden, mit zunehmender Temperatur wurde die Anzahl lebender Zellen immer kleiner (vgl. Abb. 1), während die Anzahl Zellen, in der Zählkammer gefunden, erst oberhalb 32° entschieden zu sinken begann.

Der Anteil an lebenden Zellen war bei den niedrigen Temperaturen am größten mit einem Optimum bei 12°; mit zunehmender Temperatur wurde er immer kleiner. Doch zeigte *Rh. gracilis* einen höheren Anteil lebender Zellen als *Rh. glutinis*; die Lebensdauer der Zellen muß also länger sein. Auch hierin zeigte sich die Anpassung von *Rh. gracilis* an höhere Temperatur.

Torulopsis candida. Das Wachstum dieses Pilzes zeigt ein Optimum, wenn auch wenig ausgeprägt, bei 22° (vgl. Tabelle III). Die Bildung von Trockensubstanz sowie die Anzahl der Zellen ist ungefähr gleich groß zwischen 12 und 27°. Ober- und unterhalb dieser Grenzwerte war das Wachstum sehr kümmerlich. Bei 37° war die Zellenanzahl sehr gering, eine Vermehrung konnte jedoch festgestellt werden. Gemäß

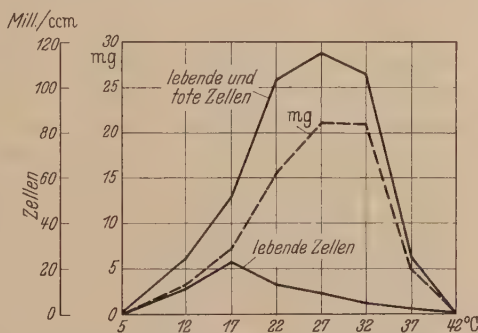


Abb. 1. Die Bildung von Trockensubstanz, die Gesamtzahl der Zellen (lebender und toter) und die Anzahl lebender Zellen bei *Rhodotorula gracilis* in 2 % Saccharose bei verschiedener Temperatur.

Tabelle III. Das Wachstum von *Torulopsis candida* bei verschiedener Temperatur.

Temperatur ° C	Zellenanzahl je cem in Millionen			% lebend	Gewicht je Kolben mg
	Zählung		Aussaat		
	Individuen	Kolonien			
5	0,81	0,58	0,64	79,0	0,9
12	43,5	18,6	13,0	29,5	17,5 ± 1,3
17	47,5	23,8	15,5	32,6	18,8 ± 1,6
22	54,2	29,2	14,0	25,8	20,0 ± 1,7
27	52,8	22,2	7,3	13,9	18,8 ± 1,4
32	0,21	0,16	0,002	0,95	0,4
37	0,06	0,05	0,0005	0,89	+
42	—	—	0	0	— *

* — = nicht wägbare, keine lebende Zellen in den Kolben.

Saito (1922) hat dieser Pilz sein Maximum bei 33 bis 35°, sein Minimum bei 0,5°.

Die Anzahl lebender Zellen war ungefähr gleich groß zwischen 12 und 22°, bei 5° und bei 32° und aufwärts waren sehr wenige Zellen am Leben. Der höchste Anteil lebender Zellen, 79 %, wurde jedoch bei 5° gefunden, und nahm mit zunehmender Temperatur ab. Bei 32 und 37° waren weniger als 1 % der Zellen am Leben, und bei 42° wuchs nach der Aussaat kein einziges Individuum aus; dort hatte also keine Vermehrung stattfinden, und die eingepfropften Zellen hatten diese Temperatur auch nicht 10 Tage lang ertragen können.

Torulopsis Molischiana. Unter den untersuchten Torulopsidaceen weicht diese Art von den anderen durch ihre Fähigkeit ab, in einem sehr ausgedehnten Temperaturgebiet wachsen zu können (Tabelle IV und Abb. 2). Nur bei der tiefsten Temperatur war die Zellenproduktion nicht wägbare. Freilich ist die Menge der gebildeten Trockensubstanz klein, bei 22°, wo die größte Menge erhalten wurde, nur 10,2 mg je Kolben, aber noch bei 42° beträgt sie 47 %, der optimalen Ausbeute. Der hier benutzte Stamm war aus einer Schleiferei mit einer Systemtemperatur von 43° isoliert worden, und wahrscheinlich ist damit noch nicht sein Temperaturmaximum erreicht. Gemäß Zikes (1911) hat dieser Pilz bei 44° gutes Wachstum, erst bei 47° hört es ganz auf. Lodder (1934) sagt, daß der Pilz noch bei 40° gut wächst.

Die Zellenanzahl ist bei 22° am größten. Trotz kleineren Gewichtes ist die Anzahl je cem etwa viermal größer als die bei *T. candida* gefundene. Die Zellen von *T. Molischiana* sind also sehr klein, und bei den tieferen Temperaturen, wo sie hauptsächlich einzeln waren, gingen sie sogar teilweise durch das G4-Filter. Durch Zählen der Anzahl Zellen, die durch das Filter passierte, konnte eine entsprechende Korrektur des Gewichtes gemacht werden. Das Gewicht muß aber in diesen

Tabelle IV. Das Wachstum von *Torulopsis Molischiana* bei verschiedener Temperatur.

Temperatur ° C	Zellenanzahl je ccm in Millionen			% lebend	Gewicht je Kolben mg
	Zählung		Aussaat		
	Individuen	Kolonien			
5	0,30	0,28	0,008	2,7	+
12	89,3	84,5	53,3	59,8	5,2 ± 0,8
17	150	130	92,8	61,8	7,6 ± 0,9
22	209	184	141	67,2	10,2 ± 1,2
27	163	139	76,5	46,9	8,7 ± 0,5
32	111	86,8	65,4	58,8	6,2 ± 0,4
37	103	74,3	17,4	16,9	6,1 ± 0,4
42	72,6	49,8	11,3	15,6	4,8 ± 0,3

Fällen recht unsicher werden, was u. a. in dem ziemlich großen mittleren Fehler zutage kommt. Bei höherer Temperatur, 27 bis 42°, kamen die Zellen in Kolonien oder in Ketten von 2 bis 3 oder sogar von 5 bis 10 vor. Die Koloniebildung war allerdings nicht so ausgeprägt wie bei *T. candida*.

T. Molischiana unterscheidet sich von den anderen *Torulopsis*-aceen auch dadurch, daß der Anteil lebender Zellen groß war. Die Aussaat gab nur bei der tiefsten und bei den zwei höchsten Temperaturen Werte, die beträchtlich niedriger waren als diejenigen, die in der Zählkammer erhalten wurden. Der Pilz zeigte auch die gleichen Optima sowohl für Zellenproduktion als auch für die größte Anzahl lebender Zellen und für den größten Anteil an keimenden Zellen, nämlich 22°. Bei 22° keimten 67% aller Zellen, zwischen 12 und 32° keimten in der Regel mehr als 50%. Noch bei 42° waren 15,6% der Zellen am Leben.

Geotrichum candidum. Dieser Pilz wächst mit einem echten Mycel, das jedoch sehr leicht in Teilstücke, Arthrosporen, zerfällt.

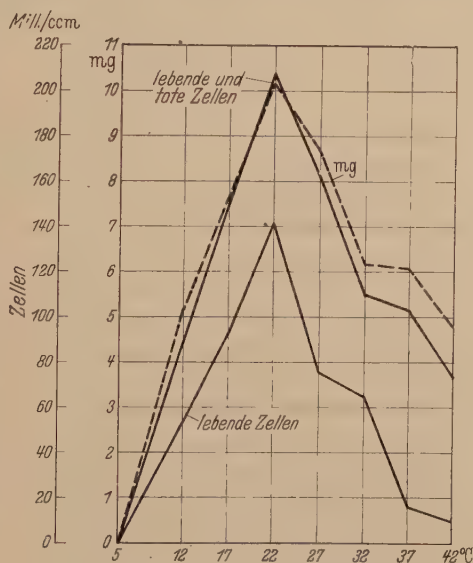


Abb. 2. Die Bildung von Trockensubstanz die Gesamtzahl der Zellen (lebender und toter) und die Anzahl lebender Zellen bei *Torulopsis Molischiana* in 2% Saccharose bei verschiedener Temperatur.

Wachstum hat bei sämtlichen Temperaturen stattgefunden, wenn es auch bei den Extremtemperaturen sehr spärlich war (vgl. Tabelle V). Die optimale Ausbeute an Mycel wurde bei 22° erhalten, und zwischen 12 und 32° war das Wachstum recht gut. Bei 37 bis 42° war es nicht makroskopisch sichtbar. Dies stimmt mit dem Vorkommen dieses Pilzes in den Schleifereien gut überein. Er ist ein Charakterpilz in Fabriken mit offenem oder halboffenem System, wo die Temperatur im Sommer zwischen 20 und 30° wechselt. In Fabriken mit geschlossenem System (Temperatur = 35 bis 56°) kommt er viel seltener vor (Rennerfelt, 1937, Tabelle 20).

Tabelle V. Das Wachstum von *Geotrichum candidum* bei verschiedener Temperatur.

Temperatur ° C	Anzahl Arthrosporen je ccm in Millionen			% lebend	Gewicht je Kolben mg
	Zählung		Aussaat		
	Individuen	Kolonien			
5	0,004	—	0,001	25,0	2,3 ± 0,4
12	1,77	0,50	0,61	34,5	14,6 ± 1,1
17	1,95	0,73	0,72	37,0	22,3 ± 1,6
22	2,44	0,81	1,03	42,2	27,6 ± 1,5
27	2,56	0,76	0,99	38,7	15,8 ± 1,2
32	1,57	0,47	0,21	13,4	11,9 ± 0,8
37	0,009	0,009	0,0013	14,4	0,5
42	—	—	0,0004	—	0,2

Bei 5° wuchs *Geotrichum candidum* nur mit langem, spärlich verzweigtem Mycel, Arthrosporen konnten nicht wahrgenommen werden. In den übrigen Kolben war die Arthrosporenbildung lebhaft bis zu 32°; die größte Anzahl wurde bei 27° angetroffen. Die Arthrosporen kamen teils einzeln vor, teils in Ketten von 3 zu 8 entweder frei in der Lösung oder noch am Mycel festsitzend. Das Temperaturoptimum für die Arthrosporenbildung liegt etwa bei 22 bis 27°, und bei diesen Temperaturen wurde auch die größte Anzahl lebender Sporen gefunden. Der Anteil lebender Arthrosporen war größer bei verhältnismäßig tieferer Temperatur mit einem Optimum bei 22°. Jedoch ist diese Bestimmung gerade bei diesem Pilz wegen der Kettenbildung recht unsicher. Im Durchschnitt bestanden die Kolonien aus 3 bis 4 Arthrosporen (vgl. die Spalten „Individuen“ und „Kolonien“ in Tabelle V), die aber bei der Aussaat wahrscheinlich nur teilweise zerfallen sind.

Phialophora fastigiata. Dieser Pilz ist einer der gewöhnlichsten Bläuepilze in Holzschliff. Die optimale Mycelbildung wurde bei 22° erhalten, und zwischen 12 und 27° war das Wachstum gut. Unter- und oberhalb dieser Grenzwerte war es sehr kümmerlich, bei den zwei höchsten Temperaturen durch Wiegen nicht feststellbar (Tabelle VI).

Tabelle VI. Das Wachstum von *Phialophora fastigiata* bei verschiedener Temperatur.

Temperatur ° C	Anzahl Konidien je ccm in Millionen		%	Gewicht je Kolben mg
	Zählung	Aussaat		
5	0,047	0,05	11,5	0,3
12	1,85	1,52	82,2	8,4 ± 1,0
17	2,21	1,18	53,0	19,3 ± 1,1
22	6,21	5,31	85,4	42,3 ± 2,2
27	0,96	0,92	95,8	16,5 ± 0,7
32	0,043	0,002	4,7	0,4
37	—	0,00005	—	+
42	—	0,00003	—	+

Das Mycel war teils submers, teils oberflächlich. Der Pilz hatte eine recht bedeutende Anzahl Konidien gebildet, die in der Flüssigkeit suspendiert waren. Bei 22° gab es gemäß Zählung nicht weniger als 6,2 Millionen Konidien je ccm, und auch bei den anderen Temperaturen zwischen 12 und 27° war die Konidienbildung ziemlich lebhaft. In den Kolben bei 5° und über 27° gab es nur wenige Konidien. Die Konidien waren immer einzeln.

Die größte Anzahl lebender Konidien wurde bei 22° gefunden, wo 5,3 Millionen von 6,2 lebendig waren. Bei 12, 17 und 27° gab es auch recht viele lebende Konidien, bei den übrigen Temperaturen waren die auswachsenden Mycelien viel spärlicher. Bei 37 und 42° wuchsen nur 50 bzw. 30 Mycelien aus, die meisten von den eingimpften Sporen waren folglich zugrunde gegangen.

Der größte Anteil lebender Konidien wurde bei 27° gefunden, wo nicht weniger als 95,8 % der Konidien lebendig waren. Doch waren auch zwischen 12 und 22° mehr als die Hälfte der Sporen am Leben. Bei 5° und bei 32° waren nur wenige Prozente lebend.

Obgleich dieser Pilz wohl mehr Konidien auf einem festen Nährboden, wie Agar oder Holz, bildet, wo die Sauerstoffzufuhr reichlich ist, kann er sich offenbar auch in einer Flüssigkeit gut vermehren. Dafür spricht auch das reichliche Vorkommen von *Phialophora*-Arten in Holzstoffabriken (*Melin und Nannfeldt*, 1934). Auch *van Beyma* (1937) beschreibt eine aus Wasser isolierte *Phialophora*-Art.

Phoma lignicola. Dieser Pilz wuchs in den Kolben mit einem vorwiegend oberflächlichen Mycel. Bei 27 und 32° wuchs der Pilz auch mit schleimigem, submersen Mycel. Die größte Mycelmenge, 114 mg, wurde bei 22° erhalten, wägbare Mengen zwischen 12 und 32° (Tabelle VII, Abb. 4, S. 31). Bei 5, 37 und 42° hatte kein sichtbares Wachstum stattgefunden.

Phoma lignicola bildete in der Flüssigkeit sehr spärlich Konidien. Bei der Zählung wurden als Höchstwert 38000 Konidien je ccm bei 22°

Tabelle VII. Das Wachstum von *Phoma lignicola* bei verschiedener Temperatur.

Temperatur ° C	Anzahl Konidien je ccm		% lebend	Gewicht je Kolben mg
	Zählung	Aussaat		
5	—	300	—	+
12	17,000	1,200	7,0	50,5 ± 2,6
17	35,000	2,100	6,0	107,5 ± 4,3
22	38,000	2,500	6,6	114,0 ± 3,6
27	12,000	600	5,0	67,4 ± 4,1
32	—	200	—	18,7 ± 1,1
37	—	11	—	+
42	—	0	—	—

festgestellt, in den anderen Kolben noch weniger. Bei einer so kleinen Zellenanzahl muß die Zählung recht unsicher werden, die Größenordnung dürfte jedoch die richtige sein. Auf festem Substrat bildet dieser Pilz häufig auftretende Pykniden mit zahlreichen Sporen. Eine mikroskopische Untersuchung des Mycels aus der Flüssigkeit zeigte keine normal ausgebildeten Pykniden.

Die Konidien gingen in der Flüssigkeit rasch zugrunde. Die größte Anzahl lebender Konidien wurde bei 22° gefunden, wo 2500 von 38000 am Leben waren. Nur bei dieser Temperatur und bei 17° gab es in den Kolben mehr Konidien je ccm als ursprünglich eingimpft worden war. Bei 37° waren nur 11 Sporen je ccm lebend und bei 42° waren alle tot. In Übereinstimmung hiermit war der Anteil der lebenden Sporen durchschnittlich sehr klein. Zwischen 12 und 27° keimten nur 5 bis 7% aus.

Pullularia pullulans. Dieser Pilz ist wohl die häufigste Ursache der Bläueschäden im Holzschliff (Robak, 1932, Melin und Nannfeldt, 1934, Rennerfelt, 1937). Wie von diesen Forschern hervorgehoben, ist dieser Pilz sehr mannigfaltig betreffs Mycelwachstum, Konidienbildung usw. In diesen Versuchen wurde ein Stamm gewählt, der sich durch reichliche, an Knospung erinnernde Konidienbildung auszeichnete.

Pullularia pullulans wuchs gut zwischen 12 und 32° mit einem ausgeprägten Optimum bei 27°. Von den untersuchten Bläuepilzen hat dieser die größte Mycelmenge gebildet, bei 27° 154 mg (Tabelle VIII). Er wuchs zum größten Teil mit schleimigem, submersen Mycel, dessen Abfiltrierung nicht leicht war. Bei 5° und oberhalb 32° wurde keine wägbare Menge erhalten. Bei tieferen Temperaturen war das Mycel hyalin, bei 22 bis 27° war die Pigmentbildung ziemlich ausgeprägt, und bei 32° war fast alles Mycel dunkel gefärbt. Mit zunehmender Temperatur nimmt also auch die Pigmentbildung zu, eine Erscheinung, die für Fäulnispilze u. a. Fritz (1923) und Bothe (1930) festgestellt haben.

Der Pilz bildete in der Flüssigkeit eine verhältnismäßig große Anzahl Konidien zwischen 12 und 32° mit einem Optimum bei 22 bis 27°.

Tabelle VIII. Das Wachstum von *Pullularia pullulans* bei verschiedener Temperatur.

Temperatur ° C	Anzahl Konidien je ccm in Millionen		Aussaat	% lebend	Gewicht je Kolben
	Zählung				mg
	Individuen	Kolonien			
5	—	—	0,0006	—	—
12	7,6	7,4	3,94	51,8	39,2 ± 2,6
17	9,1	8,7	1,20	13,2	102,2 ± 5,4
22	13,1	12,2	0,41	3,1	121,8 ± 6,0
27	12,8	12,2	0,065	0,5	154,0 ± 5,8
32	6,5	6,1	0,010	0,2	47,1 ± 3,8
37	—	—	0,000 052	—	+
42	—	—	0,000 008	—	+

Fast alle Konidien waren einzeln, wie ein Vergleich zwischen den Spalten „Individuen“ und „Kolonien“ in Tabelle VIII zeigt. Bei den Extremtemperaturen konnten die Konidien nicht gezählt werden. Bei der Aussaat auf Agar ergab sich, daß die meisten lebenden Konidien bei 12° zu finden waren, mit zunehmender Temperatur wurde die Anzahl lebender Sporen sehr rasch kleiner. Bei 5° und oberhalb 32° hatte offenbar keine Sporenbildung stattgefunden, bei den höchsten Temperaturen gab es am Ende des Versuchs nur einige wenige lebende Sporen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Aussaat wurde auch das Optimum der Prozentzahl lebender Sporen bei tieferer Temperatur, 12°, gefunden. Mit zunehmender Temperatur sank sie schnell, bei 27° z. B., der Optimaltemperatur für die Mycelbildung, war nur 0,5% der Sporen lebend. Sie verlieren also bei hoher Temperatur rasch ihre Keimungsfähigkeit.

Trichosporium heteromorphum. Von allen hier untersuchten Pilzen hat diese interessante Art die kleinste Menge Trockensubstanz gebildet (Tabelle IX, Abb. 3). Das Optimum lag bei 32 bis 37°, also relativ hoch, bei 42° wurde jedoch keine wägbare Menge erhalten. Bei 5° erfolgte auch keine wägbare Produktion, zwischen 12 und 32°

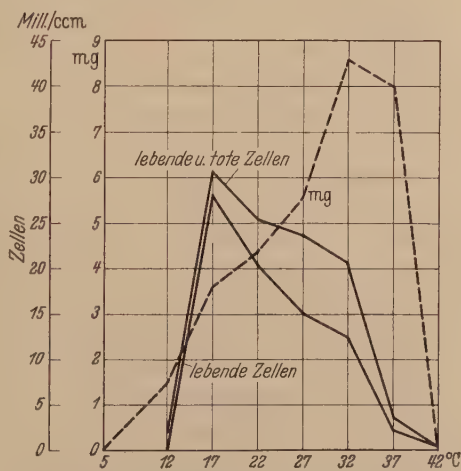


Abb. 3. Die Bildung von Trockensubstanz, die Gesamtzahl der Zellen (lebender und toter) und die Anzahl lebender Zellen bei *Trichosporium heteromorphum* in 2% Saccharose bei verschiedener Temperatur.

Tabelle IX. Das Wachstum von *Trichosporium heteromorphum* bei verschiedener Temperatur.

Temperatur ° C	Anzahl Konidien je cem in Millionen		% lebend	Gewicht je Kolben mg
	Zählung	Aussaat		
5	0,035	0,0002	0,6	+
12	2,38	0,39	16,4	1,5 ± 0,2
17	30,5	28,2	92,5	3,6 ± 0,4
22	25,4	20,4	80,2	4,4 ± 0,3
27	23,6	15,0	63,5	5,5 ± 0,4
32	20,1	12,3	61,1	8,6 ± 0,6
37	3,20	2,16	67,5	8,0 ± 0,7
42	0,07	0,01	15,7	+

stieg die Ausbeute ziemlich proportional mit der Temperatur. Wie bei *Pullularia pullulans* hatte auch hier die Temperatur einen deutlichen Einfluß auf die Pigmentbildung; bei niedriger Temperatur war die Farbe des untergetauchten Mycels schwach grün, zwischen 22 und 32° dunkelgrün und bei 37° grün bis dunkelbraun.

Trichosporium heteromorphum bildete reichlich Konidien, unter den Bläuepilzen stand er in dieser Hinsicht an erster Stelle. Das Optimum der Konidienbildung fiel jedoch nicht mit demjenigen der größten Mycelproduktion zusammen. Die Konidien, die einzeln auftraten, waren am zahlreichsten bei 17°, bis 32° nahmen sie nur langsam ab. Bei 12°, wie auch bei 37°, waren sie schon beträchtlich weniger, und bei den Extremtemperaturen ging die Konidienbildung sehr langsam.

Die größte Anzahl lebender Sporen wurde ebenfalls bei 17° angetroffen, zwischen 17 und 32° war aber die Anzahl lebender Sporen überhaupt groß (vgl. Tabelle IX und Abb. 3). Bei 5 und 12° war sie dagegen klein, ebenso bei 42°. Der größte Anteil an lebenden Sporen, 92,5 %, wurde bei 17° gefunden, und er war im Gebiet guter Konidienproduktion durchaus hoch, bei den Extremtemperaturen dagegen hatten die spärlich gebildeten Sporen auch noch eine kurze Lebensdauer.

Aspergillus fumigatus. Die Gattung *Aspergillus* umfaßt Pilze, die ihr Optimum zwischen 30 und 40° haben. Die hier untersuchte Art, die ich ab und zu in Holzschliff gefunden habe, hat ihre größte Mycelbildung bei 37° (vgl. Tabelle X). Bei 5 und 12° war das Wachstum äußerst klein, stieg danach kontinuierlich bis 37°, war aber noch bei 42° beträchtlich.

Eine Bestimmung der Sporenanzahl in der Flüssigkeit wurde bei diesem und den folgenden Pilzen nicht vorgenommen. Bei den zwei untersuchten Schimmelpilzen kam zwar spärliche Konidienbildung an der Oberfläche vor, nicht aber in der Flüssigkeit. Trotz der für *Aspergillus*-Arten optimalen Temperatur in dem Zirkulationswasser der Fabriken kommen solche Pilze in erstaunenswert kleiner Anzahl dort

vor. Dies dürfte damit zusammenhängen, daß sich die Holzfaser-suspension in stetiger Bewegung befindet. Wie *Kluyver* und *Perquin* (1933) gezeigt haben, entwickelt sich *Aspergillus flavus* in stillstehender und in sich bewogender Flüssigkeit ganz verschiedenartig.

Penicillium rugulosum. Aus Tabelle X und Abb. 4 geht hervor, daß bei diesem Pilz die größte Mycelbildung bei 32° erfolgte. Bei 5° gab es kein wägbares Mycel, bei 12 und 17° war es größtenteils submers, bei den übrigen Temperaturen war eine gute Myceldecke ausgebildet worden. Die Konidienbildung war in sämtlichen Kolben recht gering.

Tabelle X. Das Wachstum von Schimmel- und Fäulnispilzen bei verschiedener Temperatur.

Temperatur ° C	Pilze, mg Trockengewicht				
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Penicillium rugulosum</i>	<i>Pholiota mutabilis</i>	<i>Polyporus hirsutus</i>	<i>Polystictus versicolor</i>
5	+	+	0,7 ± 0,1	+	1,0 ± 0,1
12	0,6	2,1 ± 0,2	2,9 ± 0,5	0,6	5,4 ± 0,2
17	7,3 ± 0,8	28,3 ± 0,8	5,1 ± 0,7	2,8 ± 0,3	23,6 ± 1,4
22	111,0 ± 2,7	94,6 ± 2,6	9,1 ± 0,5	21,6 ± 1,2	69,5 ± 2,5
27	124,4 ± 3,4	169,0 ± 3,5	0,8 ± 0,1	45,8 ± 2,3	73,4 ± 3,6
32	128,3 ± 2,6	183,6 ± 3,8	+	58,3 ± 2,2	48,4 ± 1,5
37	140,0 ± 2,4	149,1 ± 3,1	—	40,7 ± 2,7	5,9 ± 0,4
42	112,5 ± 4,8	53,8 ± 3,3	—	4,3 ± 0,4	+

Gemäß *Thom* (1930) liegt das Temperaturoptimum der meisten *Penicillium*-Arten unterhalb 30°, nur wenige haben wie *P. rugulosum* ihr Optimum oberhalb 30°. Daß *Penicillium*-Arten in dem Zirkulationswasser recht spärlich auftreten, dürfte außer auf der immer beweglichen Flüssigkeit auch auf der meistens hohen Temperatur des Wassers beruhen.

Fäulnispilze. Die Temperaturwerte für holzzerstörende Pilze sind oftmals untersucht worden (*Humphrey* und *Siggers*, 1933, *Cartwright* und *Findlay*, 1934, *Bavendamm*, 1939). Die meisten dieser Pilze haben ihr Optimum etwa zwischen 25 und 30°, einige jedoch

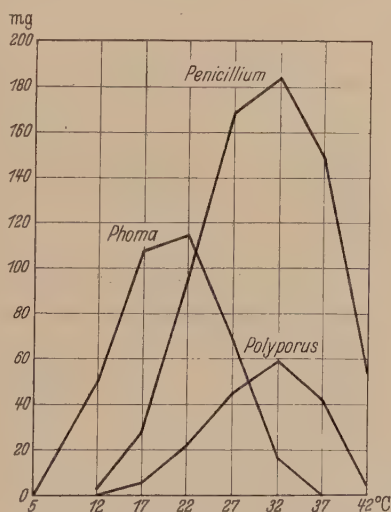


Abb. 4. Die Bildung von Trockensubstanz bei *Phoma lignicola*, *Penicillium rugulosum* und *Polyporus hirsutus* in 2 % Saccharose bei verschiedener Temperatur.

bei niedrigerer Temperatur und wieder andere bei über 30°. Aus Holzschliff sind bis jetzt nur wenige Fäulnispilze identifiziert worden (Robak, 1938), und die Angaben über ihre Temperaturverhältnisse sind noch spärlicher. Goidánich und Vivani (1938) fanden bei Kultur auf Malzagar, daß das schnellste Wachstum zweier aus Holzschliff isolierter, aber nicht identifizierter Fäulnispilze bei 25 bzw. 30° stattfand.

Pholiota mutabilis. Wie aus Tabelle X hervorgeht, ist dieser Pilz nur kümmerlich gewachsen. Sein Optimum liegt bei 22°, darüber ließ das Wachstum sehr rasch nach, bei 27° war fast gar kein Wachstum zu beobachten. Dieser Pilz gehört also zu Fäulnispilzen mit einem verhältnismäßig niedrigen Optimum. Dafür spricht auch die recht gute Entwicklung bei 12 und 17°. Nach zehntägigem Aufenthalt in 32° war das Mycel noch lebend, nicht aber in 37 und 42°.

Polyporus hirsutus. Dieser Pilz zeigte das beste Wachstum bei 27 bis 32° (vgl. Tabelle X und Abb. 4). Gemäß Humphrey und Siggers hat er sein Optimum etwa bei 28 bis 36° und kann noch bei 49° wachsen. Der hier benutzte Stamm wuchs bei 37° gut, bei 42° dagegen sehr spärlich. Das Minimum liegt etwa bei 12 bis 17°. Dieser Pilz hat also sein Optimum bei hohen Temperaturen. Im Vergleich mit *Pholiota mutabilis* war die Mycelbildung wesentlich größer.

Bei diesem Pilz wurden in den Kolben zwischen 12 und 32° Konidien in reichlicher Menge gefunden. Nebenfruchtformen, wie Konidien und Chlamydosporen, sind besonders bei *Polyporaceae* gewöhnlich (Fritz, 1923, Bavendamm, 1939).

Polystictus versicolor hatte die größte Mycelbildung bei 22 bis 27°, was gut mit den Angaben von Cartwright und Findlay, 28 bis 30°, sowie von Humphrey und Siggers, 24 bis 32°, übereinstimmt. Bei 5 bis 12° wuchs er nur langsam und ebenso bei 37°. Bei 42° hatte kein Wachstum stattgefunden, das Mycel war jedoch nicht tot.

Besprechung der Ergebnisse.

Diese Temperaturversuche haben gezeigt, daß es zwischen den untersuchten Pilzen große Verschiedenheiten in Trockensubstanzbildung, Lebensdauer der Zellen usw. gibt. Auf den folgenden Zeilen werde ich diese Verhältnisse etwas näher auseinandersetzen.

1. Trockensubstanzbildung.

Die Trockensubstanzbildung war bei den untersuchten Pilzen sehr verschieden. Um eine bessere Übersicht zu bekommen, habe ich die erhaltenen Erntegewichte in einer besonderen Tabelle (Tabelle XI) zusammengestellt. Bei den *Torulopsidaceen* war die Trockensubstanzbildung gewöhnlicherweise gering, etwa 10 bis 20 mg je Kolben beim

Temperaturoptimum. Nur *Rhodotorula glutinis* hatte beträchtlich mehr gebildet, nämlich 75 mg.

Die mit Mycel wachsenden Pilze hatten wesentlich mehr Trockensubstanz gebildet, in der Regel zwischen 50 und 150 mg bei Temperaturoptimum. *Trichosporium heteromorphum* und *Pholiota mutabilis* bildeten eine Ausnahme, indem diese Pilze nur etwa 8 bis 9 mg Trockensubstanz bildeten. Die Schimmelpilze zeigten die höchste Mycelproduktion, 140 bis 180 mg je Kolben, während die Bläue- und Fäulnispilze in der Regel eine kleinere Produktion ergaben. Nur *Pullularia pullulans* konnte in dieser Hinsicht mit den Schimmelpilzen wetteifern.

Es ist nicht leicht, eine exakte Definition des Temperaturoptimums zu geben (vgl. *Bélerhådek*, 1935, S. 163), da mehrere Faktoren mit in Betracht gezogen werden müssen. Für die Bildung der Trockensubstanz habe ich diejenige Temperatur als die optimale bezeichnet, bei der die größte Menge Trockensubstanz erhalten wurde. Bei den untersuchten Pilzen zeigte diese Temperatur recht verschiedene Werte. Bei den *Torulopsidaceen* lag sie bei 22°, nur für *Rhodotorula gracilis* bei 27 bis 32° (Tabelle XI).

Tabelle XI. Die Produktion von Trockensubstanz bei den verschiedenen Pilzen.

Pilze	Gewicht je Kolben in mg bei							
	5°	12°	17°	22°	27°	32°	37°	42° C
<i>Rhodotorula glutinis</i>	+	17,6	47,1	75,0	16,9	0,4	(+)	(+)
„ <i>gracilis</i>	0,2	3,2	7,3	15,5	21,4	21,0	5,0	+
<i>Torulopsis candida</i>	0,9	17,5	18,8	20,0	18,8	0,4	(+)	—
„ <i>Molischiana</i>	+	5,2	7,6	10,2	8,7	6,2	6,1	4,8
<i>Geotrichum candidum</i>	2,3	14,6	22,3	27,6	15,8	11,9	0,5	0,2
<i>Phialophora fastigiata</i>	0,3	8,4	19,3	42,3	16,5	0,4	(+)	(+)
<i>Phoma lignicola</i>	(+)	50,5	107,5	114,0	67,4	18,7	(+)	—
<i>Pullularia pullulans</i>	(+)	39,2	102,2	121,8	154,0	47,1	(+)	(+)
<i>Trichosporium heteromorphum</i>	(+)	1,5	3,6	4,4	5,5	8,6	8,0	+
<i>Aspergillus fumigatus</i>	(+)	0,6	7,3	111,0	124,4	128,3	140,0	112,5
<i>Penicillium rugulosum</i>	(+)	2,1	28,3	94,6	169,0	183,6	149,1	53,8
<i>Pholiota mutabilis</i>	0,7	2,9	5,1	9,1	0,8	(+)	—	—
<i>Polyporus hirsutus</i>	(+)	0,6	2,8	21,6	45,8	58,3	40,7	4,3
<i>Polystictus versicolor</i>	1,0	5,4	23,6	69,5	73,4	48,4	5,9	(+)

(+) = lebend, aber kein Zuwachs. + = Zuwachs, aber nicht wägbare.

— = keine lebende Zellen in den Kolben.

Bei zwei der Bläuepilze, *Phialophora fastigiata* und *Phoma lignicola*, lag das Temperaturoptimum bei 22°, für *Pullularia pullulans* bei 27° und für *Trichosporium heteromorphum* sogar bei 32 bis 37°. Die Schimmelpilze hatten ihr Optimum bei 32 bis 37°, während jeder der Fäulnispilze sein eigenes Optimum hatte, *Pholiota mutabilis* bei 22°, *Polystictus versicolor* bei 27° und *Polyporus hirsutus* bei 32°.

Es wurden auch einige Beobachtungen über das Temperaturminimum bzw. das Temperaturmaximum dieser Pilze gemacht. Was das Minimum betrifft, so hatten nur wenige der Pilze bei 5° während 10 Tage eine wägbare Mycelmenge gebildet. *Geotrichum candidum* hatte die größte Produktion mit 2,3 mg je Kolben (vgl. Tabelle XI). Wenn auch in den meisten Fällen keine Vermehrung bei dieser Temperatur stattgefunden hatte, so konnte jedoch durch Aussaat auf Agar festgestellt werden, daß in allen Kolben wenigstens ein Teil des Impfmateri als am Ende des Versuchs noch am Leben war.

Bei 12° hatten die meisten Pilze eine ganz beträchtliche Mycelmenge gebildet, einige der Pilze mit hohem Temperaturoptimum, wie *Aspergillus fumigatus* und *Polyporus hirsutus*, jedoch nur eine kaum wägbare Mycelmenge.

Das Temperaturmaximum zeigte recht große Verschiedenheiten (Tabelle XI). Bei den Torulopsidaceen lag es für *Rhodotorula glutinis* bei 32°, für *Rh. gracilis* bei 37 bis 42°, bei der letztgenannten Temperatur konnte die Vermehrung durch Aussaat festgestellt werden. Bei *Torulopsis candida* lag es bei 32, bei 42° waren alle Zellen in den Kolben tot. *Torulopsis Molischiana* wuchs noch bei 42° gut. Bei den Bläuepilzen lag das Temperaturmaximum bei 32 bis 37°, mit Ausnahme von *Trichosporium heteromorphum*, wo es bei 37 bis 42° lag. Bei den Schimmelpilzen war das Maximum nicht mit 42° erreicht, auch nicht bei *Polyporus hirsutus*, während es für *Polystictus versicolor* bei 37° zu finden war, und für *Pholiota mutabilis* bei der verhältnismäßig niedrigen Temperatur von 27°.

In Tabelle XII sind die Q_{10} -Werte der Mycelbildung, aus Tabelle XI berechnet, für einige der Pilze zusammengestellt. Eine durchgehende Zunahme des Trockengewichtes etwa zwei- bis dreimal für eine Temperaturerhöhung von 10° konnte nur bei einigen der Pilze festgestellt werden, z. B. *Rhodotorula gracilis* und *Trichosporium heteromorphum*. Bei denjenigen Pilzen, die ein relativ hohes Temperaturoptimum haben, war der Q_{10} -Wert bei tiefer Temperatur sehr groß, z. B. für *Aspergillus fumigatus* 185 bei Q_{12-22} und für *Penicillium rugulosum* 45 bei dem

Tabelle XII. Die Q_{10} -Werte der Mycelbildung bei einigen der untersuchten Pilze.

Pilze	Q_{12-22}	Q_{17-27}	Q_{22-32}	Q_{27-37}
<i>Rhodotorula gracilis</i>	4,8	2,9	1,4	
<i>Pullularia pullulans</i>	3,1	1,5		
<i>Trichosporium heteromorphum</i>	2,9	1,5	2,0	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	185	17,0	1,2	1,1
<i>Penicillium rugulosum</i>	45,0	6,0	1,9	
<i>Polyporus hirsutus</i>	35,6	16,3	2,7	

gleichen Temperaturintervall. Gemäß *Bélerhádek* ist dies eine recht allgemeine Erscheinung.

2. Knospung und Konidienbildung bei den Pilzen.

Die Torulopsidaceen, die durch Knospung wachsen, bildeten in der Flüssigkeit eine große Anzahl Zellen, bei dem Temperaturoptimum etwa 50 bis 200 Millionen je ccm. Bei den Grenzwerten war die Zellenanzahl natürlich viel kleiner. Für die physiologisch nahestehenden Hefen wurde festgestellt, daß Knospung zwischen 0 und 47°, für die meisten zwischen 0,5 und 40°, stattfinden kann. (*Tabulae Biologicae*.) *Richards* (1928) fand, daß *Saccharomyces cerevisiae* sich zwischen 4 und 44° vermehren kann, daß aber 9 und 30° kritische Temperaturen für die Knospung sind. Ähnliche Grenzwerte treten bei den Torulopsidaceen auf (*Saito*, 1922, *Harrison*, 1928). Von den untersuchten Bläuepilzen hatten drei in größerem Ausmaße in Flüssigkeit Konidien gebildet, nämlich *Phialophora fastigiata*, *Pullularia pullulans* und *Trichosporium heteromorphum*. Die Schimmelpilze bildeten Konidien nur auf dem oberflächlichen Mycel. Mit Ausnahme von *Polyporus hirsutus* wurden bei den Fäulnispilzen keine vegetativen Fortpflanzungsorgane gefunden.

Die Anzahl Zellen oder Sporen in der Flüssigkeit war am größten bei einer für jede Art charakteristischen Temperatur. Bei den Torulopsidaceen war diese Temperatur die gleiche, bei der die größte Menge Trockensubstanz gebildet wurde, was ganz natürlich ist, da die Trockensubstanz bei diesen Pilzen ausschließlich aus Zellen besteht, die durch Knospung gebildet sind.

Bei den *Hyphomycetes* waren die Temperaturwerte für die größte Trockensubstanzbildung und für die Bildung der größten Menge Konidien nicht immer identisch. In meinen Versuchen traf dies nur für *Phialophora fastigiata*, bei 22°, zu. Bei *Geotrichum candidum* wurde die größte Mycelbildung bei 22° erhalten, die größte Anzahl von Arthrosporen dagegen bei 27°. Bei *Pullularia pullulans* verhielt es sich umgekehrt: die größte Mycelbildung wurde bei 27° erhalten, die größte Konidienmenge dagegen bei 22°. Noch ausgeprägter war dieser Unterschied bei *Trichosporium heteromorphum*, wo das Temperaturoptimum der Mycelbildung bei 32 bis 37° lag, die größte Anzahl Konidien aber bei 17° gefunden wurde, also bei einer wesentlich niedrigeren Temperatur.

3. Lebensdauer der Zellen und Konidien.

Eine Frage von großem Interesse ist die Lebensdauer der gebildeten Zellen und Konidien. Bei keinem der Pilze traf es ein, daß sämtliche Zellen in der Flüssigkeit am Ende des Versuchs lebend waren. Ein größerer oder kleinerer Teil der gebildeten Zellen war im Laufe des

Versuchs zugrunde gegangen. Zufolge Anhäufung schädlicher Stoffwechselprodukte u. dgl. kommt der Zuwachs früher oder später zu einem Stillstand. Dieser Zeitpunkt ändert sich nicht nur mit den verschiedenen Pilzen, sondern auch mit der Temperatur: bei höherer Temperatur geht die Anhäufung schneller, und das Wachstum hört früher auf als bei tieferer Temperatur. Wahrscheinlich wären andere Verhältnisse zwischen lebenden und toten Zellen bei den Torulopsidaceen erhalten worden, wenn die Versuche nach 4 oder 5 Tagen unterbrochen wären. Richards (1928) hat gezeigt, daß die Vermehrung von *Saccharomyces cerevisiae* binnen 2 bis 30 Stunden nach der Aussaat geradlinig erfolgt, bei längerer Versuchszeit macht sich der Alkoholgehalt geltend. Bei den Torulopsidaceen, die gewöhnlicherweise keinen oder nur sehr wenig Alkohol bilden, dauert es ziemlich lange, bis das Wachstum aufhört. Bei *Rhodotorula glutinis* geht das Wachstum erst nach 7 bis 8 Tagen deutlich zurück (Rennerfelt, 1939a).

Ein ungefähres Bild von dem Verhältnis zwischen lebenden und toten Zellen wurde dadurch erhalten, daß gleichzeitig mit der Zählung eine Aussaat auf Agar unternommen wurde. Die Ergebnisse sind recht interessant. In einigen Fällen war sowohl die Gesamtzahl der Zellen (lebender und toter) in der Flüssigkeit als auch die Anzahl lebender Zellen bei der gleichen Temperatur am größten. Dies traf bei *Torulopsis Molischiana* und *Phialophora fastigiata* bei 22°, und bei *Trichosporium heteromorphum* bei 17° zu.

In der Regel war aber die relative Anzahl lebender Zellen in der Flüssigkeit am größten bei einer Temperatur, die 5 oder 10° niedriger war als diejenige, bei der die größte Gesamtzahl der Zellen gefunden wurde. So verhielt es sich bei den beiden *Rhodotorula*-Arten, bei *Torulopsis candida* und bei *Pullularia pullulans*. Sehr deutlich geht dies bei *Rhodotorula gracilis* hervor (Abb. 1, S. 23). Die Zellenproduktion war groß mit einem Optimum bei 27°. Am Ende des Versuchs wurden dort 115 Millionen Zellen je ccm gefunden. Davon waren aber nur 9,4 Millionen am Leben, die anderen waren schon tot. Die größte Anzahl lebender Zellen trat bei diesem Pilz bei einer viel tieferen Temperatur, 17°, auf. Dort waren von den 52,5 Millionen Zellen je ccm nicht weniger als 23,8 Millionen lebend, also beinahe die Hälfte. Bei 12° war die Anzahl lebender Zellen schon geringer, ebenso bei 22° und mit zunehmender Temperatur sank sie immer mehr (vgl. die unterste Kurve in Abb. 1).

Eine nähere Analyse dieser Verhältnisse würde sicher interessante Ergebnisse zeitigen, sie erfordert aber eine breitere experimentelle Unterlage, als ich hier habe. Soviel kann jedoch gesagt werden, daß die Menge Trockensubstanz, die bei einer gewissen Temperatur gebildet wird, teils von der Teilungsgeschwindigkeit der Zellen, teils von ihrer Lebensdauer bei dieser Temperatur abhängig sein muß. Bei *Rhodo-*

torula gracilis beginnt die Lebensdauer schon bei einer ziemlich niedrigen Temperatur abzunehmen, es werden demnach weniger lebende Zellen in der Nährlösung. Dies wird aber dadurch kompensiert, daß die Teilungsgeschwindigkeit bei höherer Temperatur größer ist. Bei 17° gibt es zwar viele lebende Zellen in der Nährlösung, die Teilungsgeschwindigkeit ist aber klein, was eine verhältnismäßig geringe Zellenproduktion ergibt. Bei 27° gibt es viel weniger lebende Zellen in den Kolben, sie müssen aber eine große Teilungsgeschwindigkeit haben, da die absolute Zellenanzahl dort mehr als doppelt so groß ist.

Von besonderem Interesse ist das Wachstum bei 12° bzw. 37°. Wie aus Tabelle II hervorgeht, sind in beiden Fällen eine praktisch genommen gleich große Anzahl Zellen gebildet worden, etwa 25 Millionen je ccm. Was aber die Anzahl lebender Zellen in den Kolben betrifft, so gab es große Verschiedenheiten: bei 12° waren am Ende des Versuchs 51,8 % der Zellen lebend, bei 37° dagegen nur 6,1 %. Es ist offenbar, daß das Wachstum bei diesen beiden Temperaturen nicht in der gleichen Weise stattgefunden hat. Bei 12° geht die Zellteilung langsam, andererseits aber sterben die Zellen nicht so schnell. Bei 37° dagegen ist die Sterblichkeit viel größer, dies wird aber durch eine größere Geschwindigkeit der Zellteilung kompensiert. Das Endergebnis ist in beiden Fällen das gleiche.

Auf diesen zwei Faktoren, Geschwindigkeit der Zellteilung und Sterblichkeit, daneben auch auf den Nahrungsverhältnissen u. dgl., beruht das Aussehen des Wachstumsverlaufes. Bei der Temperatur, bei der diese beiden Faktoren am wenigsten antagonistisch wirken, wird die größte Zellenproduktion erhalten. Für *Rhodotorula gracilis* traf dies bei 27° ein.

Ähnlich wie bei *Rhodotorula gracilis* nahm die Lebensdauer der Zellen bei *Rhodotorula glutinis*, *Torulopsis candida* und *Pullularia pullulans* mit zunehmender Temperatur schnell ab. Bei anderen wie *Torulopsis Molischiana* (Abb. 2), *Trichosporium heteromorphum* (Abb. 3) und *Phialophora fastigiata*, war auch bei hohen Temperaturen ein großer Prozentsatz der Sporen lebendig. Die Sporen oder Zellen der untersuchten Pilze müssen demnach ganz verschiedene chemische Zusammensetzung oder sonstige Konstitution haben, die es ihnen erlaubt, die Versuchstemperaturen in sehr verschiedenem Maße zu überleben, was ganz verschiedenen Wachstumsverlauf zur Folge hat.

4. Vergleich mit den Verhältnissen in den Schleifereien.

Betreffs der Infektionsverhältnisse in den Schleifereien geben die Versuchsergebnisse einige Aufschlüsse. Freilich weichen die Versuchsbedingungen in einigen Punkten von den Verhältnissen in den Holzstoffabriken ab: als Nährsubstrat hat die Fasersuspension einen ganz

anderen Wert als 2% Saccharose, und die immer bewegliche Flüssigkeit muß auf das Wachstum einen großen Einfluß ausüben. Trotzdem gibt es große Ähnlichkeiten. In dem zirkulierenden System überwiegen die *Torulopsidaceen* ganz beträchtlich an Anzahl (*Rennerfelt*, 1937, Tabellen 10 bis 17). Wie wir in diesen Versuchen gesehen haben, vermehren sich diese Pilze sehr rasch in Flüssigkeit. Der Keimgehalt dieser hefeähnlichen Pilze je ccm war demjenigen der anderen Pilze weit überlegen. Von den Bläuepilzen kommen *Phialophora fastigiata* und *Pullularia pullulans* am häufigsten vor. Diese zwei Pilze können sich neben *Trichosporium heteromorphum*, wie oben dargelegt, in Flüssigkeit durch Konidien gut vermehren. Der letztgenannte Pilz kann mitunter in großen Mengen auftreten (*Melin und Nannfeldt*, 1934). Die Schimmelpilze kommen zwar regelmäßig vor, beinahe immer jedoch in kleiner Anzahl, was darauf hindeutet, daß ihre Wachstumsbedingungen in der pulsierenden Fasersuspension, trotz der günstigen Temperatur, nicht so gut sind. Quantitative Angaben über den Gehalt des Zirkulationswassers an Diasporen von Fäulnispilzen fehlen noch in der Literatur. Anscheinend dürfte die Diasporenanzahl jedoch recht gering sein, die meisten dieser Pilze sind wohl kaum einer nennenswerten Vermehrung im System fähig.

Die Anzahl der Diasporen in der Fasersuspension wechselt von Fabrik zu Fabrik, was in hohem Maße auf den Herstellungsverhältnissen beruht, insbesondere spielt die Systemtemperatur eine entscheidende Rolle. Gemäß *Englund* (1935) ist die Anzahl bei 37 bis 39° am größten, gemäß meinen Erfahrungen bei 30 bis 35°. Folgende Aufstellung, die ich einer früheren Arbeit entnehme (*Rennerfelt*, 1937), zeigt den Einfluß der Systemtemperatur auf den Keimgehalt. Die Fasersuspension enthielt bei:

39° C:	800	Diasporen	je	ccm
42° C:	630	„	„	„
45° C:	320	„	„	„
48° C:	270	„	„	„

Gemäß *Bade* (1935) enthielt Holzstoff, hergestellt bei:

42° C:	102000	Diasporen	je	g
48° C:	45000	„	„	„
54° C:	18600	„	„	„
60° C:	11400	„	„	„

Mit zunehmender Temperatur sinkt also die Keimzahl ganz beträchtlich. Wird die Temperatur noch mehr erhöht, nähert sich die Diasporenanzahl dem Wert Null je ccm. Diese mit zunehmender Temperatur allmählich fortschreitende Sterilisierung der Fasersuspension führt zu einer qualitativen Veränderung der Mikroflora. Wie meine Versuche schon gezeigt haben, die nur eine kleine Anzahl aller der in Holzschliff gefundenen Mikroorganismen umfassen, ist die Wärme-

resistenz bei verschiedenen Arten sehr verschieden. Auf die komplizierten Verhältnisse, die in dem praktischen Betrieb bei Änderung der Systemtemperatur entstehen, kann ich hier nicht eingehen. Ich erinnere nur an die schweren Fäulnisschäden, die in der Regel dann auftreten, wenn die Temperatur bis über 50° erhöht wird (Bade, 1938, Englund, 1939).

Bei 30 bis 35° ist ein gewöhnlicher Wert der Infektion 1000 bis 2000 Diasporen je ccm. Mit der Anzahl verglichen, die in diesen Versuchen bei einigen Pilzen erhalten wurden (bei 32° 65 Millionen Zellen je ccm von *Torulopsis Molischiana* und von *Trichosporium heteromorphum* 12,3 Millionen Konidien), ist dieser Wert sehr niedrig. Wie ich früher gezeigt habe (Rennerfelt, 1938), ist jedoch der Zuwachs in Zuckerlösungen einer ganz anderen Größenordnung als der in einer Fasersuspension. Von *Rhodotorula gracilis* z. B. wurden nach 48 Stunden bei 32° in 5 % Glucose 168000 Zellen je ccm gefunden, in einer 0,5 %igen Fasersuspension nur 565 Zellen. Unter günstigen Verhältnissen kann jedoch auch in einer Fasersuspension die Zellenproduktion eine beträchtliche Höhe erreichen; in einer 0,5 %igen Suspension, von geflößter Fichte hergestellt, wurden nach 96 Stunden bei 22° 1,03 Millionen Zellen von *Rhodotorula glutinis* gefunden (Rennerfelt, 1939b).

Die Erklärung dessen, daß die Anzahl Diasporen in der Fasersuspension in einer Fabrik so verhältnismäßig klein ist, auch bei einer für die Pilze günstigen Temperatur, dürfte wohl vor allem darin gesucht werden, daß ein großer Teil der Pilzdiasporen mit dem fertigen Schliff oder mit weggehendem Abwasser immerfort weggeführt wird. Wenn das System geschlossen wird, so daß soviel wie möglich von der Flüssigkeit in stetiger Zirkulation geht, werden freilich Diasporen nur mit dem fertigen Schliff weggeführt. Dann wird aber die Temperatur im System so hoch, daß die Pilze sich an der oberen Grenze ihrer Existenzmöglichkeit befinden. Nur mit Schwierigkeit können sie wachsen und sich vermehren, und die Lebensdauer der Zellen wird kurz.

Zusammenfassung.

1. 14 verschiedene Holzschliffpilze, den *Torulopsidaceen*, den *Bläue*-, *Schimmel*- und *Fäulnis*pilzen zugehörend, wurden auf ihre Beeinflussung durch die Temperatur untersucht. Die Pilze wurden in Flüssigkeit bei Temperaturen zwischen 5 und 42° gezüchtet.

2. Das optimale Wachstum (= größte Bildung von Trockensubstanz) fand bei den *Torulopsidaceen* etwa bei 22 bis 27°, bei den *Bläue*pilzen bei 22 bis 32°, bei den *Schimmelpilzen* bei 32 bis 37° und bei den *Fäulnis*pilzen bei 22 bis 32° C statt. Temperaturminimum und Temperaturmaximum des Wachstums zeigten bei den verschiedenen Pilzen verschiedene Werte.

3. Bei den *Torulopsidaceen* wurde die größte Anzahl Zellen bei der gleichen Temperatur gefunden, bei der das höchste Erntegewicht erhalten wurde. Bei den *Bläuepilzen* wurde in der Regel die größte Menge Konidien bei einer Temperatur gebildet, die tiefer lag als die Optimumtemperatur der Mycelbildung.

4. Bei tiefer Temperatur war in der Regel die Zellteilungsgeschwindigkeit gering und die Lebensdauer der Zellen lang. Bei höherer Temperatur teilten sich die Zellen schneller, gleichzeitig wurde aber die Sterblichkeit größer. In dieser Hinsicht konnten jedoch große Unterschiede bei den einzelnen Pilzen festgestellt werden.

5. Zuletzt werden die Versuchsergebnisse mit den Verhältnissen in den Holzschliffabriken verglichen. Auf die Zusammensetzung und Entwicklung der Mikroflora in der Fasersuspension hat die Temperatur in dem System einen großen Einfluß.

Literatur.

- Bade, O., Papirjournalen **23**, 1935. — *Derselbe*, Papirindustriens Forskningsinstitut 1938. — *Bavendamm*, W., Handb. d. Biol. Arbeitsmethod., Abt. II, **2**, 927, 1939. — *Bélehrádek*, J., Temperature and Living Matter, Berlin 1935. — *Beyma*, F. H. van, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **96**, 411, 1937. — *Boas*, F., Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **53**, 495, 1935. — *Bothe*, F., ebenda **48**, 394, 1930. — *Cartwright*, K. St. G., u. W. P. K. Findlay, Ann. of Bot. **48**, 481, 1934. — *Englund*, B., Papp. och Trävarutidskrift för Finland **16**, 1935. — *Derselbe*, Zellstoff und Papier **19**, 336, 1939. — *Fritz*, Clara W., Proceed. and Transact. of Royal Soc. of Canada **27**, 191, 1923. — *Goidànich*, G., G. Borzini, A. Mezzetti u. W. Vivani, Ricerche sulle alterazioni e sulla conservazione della pasta di legno destinata alla fabbricazione della carta, Rom 1938. — *Harrison*, F. C., Proceed. and Transact. of Royal Soc. of Canada **32**, 187, 1928. — *Humphrey*, C. J., u. P. W. Siggers, J. Agric. Res. **47**, 997, 1933. — *Kluger*, A. J., u. L. H. C. Perquin, Biochem. Zeitschr. **266**, 68, 1933. — *Lodder*, J., Die anaskosporogenen Hefen, Amsterdam 1934. — *Melin*, E., u. J. A. Nannfeldt, Svenska Skogsvårdsföreningens Tidskr. **32**, 397, 1934. — *Muntch*, O., Centralbl. f. Bakt. II, **114**, 438, 1929. — *Rennerfelt*, E., Svenska Skogsvårdsföreningens Tidskr. **35**, 47, 1937. — *Derselbe*, Acta Horti Gotoburgensis **12**, 153, 1938. — *Derselbe*, Bot. Notiser **232**, 1939a. — *Derselbe*, Svensk Papperstidning **42**, 2, 1939b. — *Richards*, O. W., J. of Phys. Chem. **32**, 1865, 1928. — *Robak*, H., Nyt Magazin f. Naturvidenskaberne **71**, 185, 1932. — *Derselbe*, Friesia **1**, 91, 1933. — *Derselbe*, Nyt Magazin f. Naturvidenskaberne **78**, 113, 1938. — *Saito*, K., Japanese J. of Bot. **1**, 1, 1922/23. — *Thom*, C., The Penicillia, Baltimore 1930. — *Wohlfel*, T., Centralbl. f. Bakt. I, **127**, 492, 1933. — *Zikes*, H., ebenda II, **30**, 625, 1911.

(Aus dem Laboratorium für Mikrobiologie der König Alexander-Universität in Ljubljana, Jugoslawien).

Fett aus *Mucor mucedo*.

Von

M. Blinc und M. Bojce.

(Eingegangen am 1. Februar 1941.)

Mit der vorliegenden Arbeit knüpfen wir an ältere Untersuchungen über die Fettbildung in *Mucoreen* an. In den Jahren 1917/18 wurde von *L. von Portheim* ein Patent angemeldet, wonach *Mucor mucedo* als Fettquelle auszuwerten ist. Dieser Schimmelpilz wurde von *L. von Portheim* und *M. Samec* auch auf der Sulfitablauge mit gutem Erfolge gezogen. Die im Jahre 1918 unterbrochenen Versuche werden hier systematisch fortgesetzt, um die Wachstumsbedingungen, die Fettbildung und die Natur des Fettes aus *Mucor mucedo* eingehender kennenzulernen¹.

Wir zogen den Pilz aus frischem Pferdemist. Diesen ließen wir einige Tage unter einer Glasglocke bei Wassergegenwart liegen. Die auftretenden *Mucor racemosus* und *Pilobolus cristallinus* konnten wir mit freiem Auge erkennen, während wir *Mucor mucedo* in dem Gemisch der Pilzrasen nach den Literaturangaben zuerst nur vermuteten. Nach mehrmaligem Impfen der mikroskopisch erkennbaren, auf unverzweigten Sporangienträgern sitzenden Sporangien in andere Nährmedien gelang uns seine Reinkultur. Die Trennung vom *Mucor racemosus* gelang erst nach öfterer elektiver Überimpfung der später auch makroskopisch sichtbaren *Mucedosporangien* auf Reis. Die Eigenschaften des rein gezogenen *Mucor mucedo* stimmen mit den in der Literatur angegebenen Merkmalen überein.

Die Sporen sind im ausgereiften Zustande regelmäßig oval mit leicht abgestumpften Biegungen und fallen durch ihre durchwegs gleichen Größen-dimensionen ($6:12\ \mu$) auf. Man hat den Eindruck, daß die in dem Sporangium entstandenen Sporen schon in diesem gleich groß sind und auch später gleichartig weiterwachsen. Ihr Inneres ist glatt, ebenso glatt ist ihr Rand. Die manchmal bis zu einer Höhe von 5 cm und mehr gewachsenen Sporangienträger sind unverzweigt und tragen an ihrem oberen Ende die Fruchtkapsel, die bei jungen Kolonien hell getönt, im Reifezustand aber dunkel gefärbt erscheint. Die mikroskopische Untersuchung ergab weder Gemmenbildungen noch Kugelzellen. Die Kolumella erschien mitunter im Lichtfelde deutlich gelb-rosa gefärbt.

¹ Über Fettbildung bei anderen Mikroben siehe *G. Haeseler* u. *H. Fink*, Zeitschr. f. Spir.-Ind. 63, 592, 1940.

Die Sporen quellen vor der Auskeimung an und treiben an einem Ende zu dem gewöhnlichen sternartigem Mycel aus. In den Hyphen bemerkt man schon in den ersten Tagen ausnahmslos Fetttropfen (Sudanreaktion) und Hohlräume. Im Sporangiumträger und in der Kolumella konnten wir jedoch keine Strukturierung und auch keinen Fettgehalt nachweisen. Nach systematischen mikroskopischen Beobachtungen konnten wir feststellen, daß die Fettmenge in den Hyphen Schwankungen unterworfen ist und mit zunehmendem Alter abnimmt.

In einer Versuchsserie prüften wir den Einfluß des Substrates auf das Wachstum des bei Zimmertemperatur in 300 ccm Erlenmeyerkölbchen gezogenen Pilzes. Der Pilz wuchs besonders gut auf Würze, auf *Hennebergscher* Schimmelpilzlösung Nr. 2¹ mit 10 %iger Maltose anstatt Saccharose und auf Reis. Schon nach 3 Tagen entwickelten sich auf dem letztgenannten Substrat schöne Sporangienträger, die die zuerst weißen, doch bald darauf dunkel gefärbten Sporangienköpfchen trugen. Bei vollkommen ausgebildetem Rasen erscheinen die Träger in gelblich-brauner Farbe und besitzen einen seidenartigen Glanz. Auf flüssigen Substraten wächst der größere Teil der Pilzmasse in das Substrat hinein und bildet schließlich eine feste, einheitliche Pilzdecke, wie wir es auf Würze besonders gut beobachten konnten. Auf anderen Nährböden [Schimmelpilznährlösung Nr. 2 nach *Henneberg* mit Saccharose oder Dextrose, Lactose bzw. Galaktose, ferner eine 10 %ige Dextrinlösung (Dextrinum album), ein 10 %iger Kartoffelstärkekleister, der 3 Stunden bei 120° C gekocht worden war] war das Wachstum des Pilzes schlecht. Wohl bilden sich auf dem 10 %igen Kleister spärliche Sporangienträger aus, auch auf den übrigen zuckerhaltigen Substraten bemerkt man nach 7 Tagen eine beginnende Entwicklung, doch machen die gewachsenen Kolonien den Eindruck einer zurückgebliebenen oder degenerierten Wachstumsform. Sehr schöne Rasenform erhielten wir auf 2,5 %iger Melasse, doch entwickelten sich auf diesem Substrat vorwiegend fettlose Hyphen.

Wie immer auch die Kolonien ausfielen, sie alle wuchsen ausnahmslos dem Lichte zu und bildeten so bei seitlicher Beleuchtung stark gebogene Hyphenfelder. Durch Wechsel der Temperatur haben wir uns überzeugt, daß der Pilz bei 37° C nicht mehr wächst²; sehr gutes Wachstum beobachteten wir bei 25 und 20° C. Bei tieferen Temperaturen verlangsamt sich das Wachstum wesentlich.

Zur Beurteilung der Ausbeute an Pilzsubstanz und Fett verglichen wir bei einer Reihe von Versuchen die verbrauchte Zuckermenge mit der gewonnenen trockenen Pilzmasse und dem daraus gewonnenen

¹ *W. Henneberg*, Handbuch d. Gärungsbakteriologie, I. Bd., S. 53. Berlin, P. Parey, 1926. — ² 10 %ige Maltoselösung mit *Hennebergschen* Salzen Nr. 2.

Rohfett. Verwendet wurden 50 ccm der *Hennebergschen* Salze Nr. 2 mit Variation des Zuckers (Saccharose-Dextrose-Maltose-Galaktose-Lactosezusatz), sowie eine 10 %ige Dextrin- und eine 10 %ige Kartoffelstärkelesterlösung und Würze von 10⁰ Balling bei 25⁰ C. Am günstigsten wurde der Zucker auf Würze ausgenutzt.

In einer zweiten Versuchsserie wechselten wir die Maltosekonzentrationen (15, 10, 5 %) auf der *Hennebergschen* Pilzlösung Nr. 2. Wir ließen die Ansätze 30 Tage bei 25⁰ C stehen. Die 10- und die 5 %ige Maltoselösung erwiesen sich in bezug auf die ausgenutzte Zuckermenge nahezu gleichwertig; bei 15 %iger Maltosekonzentration war die Ausnutzung schlechter.

Eine weitere Versuchsreihe sollte über das Wachstum und die Zuckerausnutzung bei verschiedenem p_H auf 10 %iger Maltoselösung Aufschluß geben. Die Abänderung der Wasserstoffionenkonzentration erreichten wir, wie in einer früheren Arbeit beschrieben¹, durch verschiedene relative Mengen an primärem und sekundärem Kaliumphosphat in der *Hennebergschen* Salzlösung Nr. 2. Mit fallenden p_H -Werten entwickelte sich der Pilz weniger günstig; die beste Entwicklung und die beste Zuckerausnutzung fanden wir bei p_H 7,5. Besonders gut war die *Hennebergsche* Schimmelpilzlösung Nr. 1², also 10 %ige Dextrose als Substrat und 1 %iges Pepton neben anderen Salzen, woraus ein großes Stickstoffbedürfnis zu folgern wäre.

Zur Aufzucht des Pilzes in größeren Mengen wählten wir vorläufig nach *Hennebergschen* Angaben bereitete Würze als Substrat. Bei eigensaurer Reaktion der Würze erzielten wir bei den Großversuchen ein voll befriedigendes Ergebnis. Nur einige Kulturen bestanden aus in das Substrat wachsendem Mycel, das die ganze Oberfläche einnahm. Sehr oft wuchsen die Kolonien nur inselartig aus, oder sie bestanden fast nur aus aufrecht stehenden Sporangienträgern, die als Fettquelle nicht in Betracht kamen. Bei Stillstand der Kulturen entwickelten sich oft Bakterien auf den Zellwänden (*Bacillus subtilis*, *Fäulnisbakterien*). Solche Kulturen mußten wir verwerfen.

Wir versuchten die Wachstumsbedingungen zu verbessern, indem wir zu der Würze von 10⁰ Balling die *Hennebergschen* Salze Nr. 2 (10 %ig), ein anderes Mal 1 %iges Pepton zusetzten, jedoch ohne besonderen Erfolg. Bessere Ergebnisse erzielten wir durch Neutralisation mit Natriumcarbonat. Durch diesen Zusatz wurden alle Schwierigkeiten überwunden. Die Substratoberfläche war dicht bewachsen, die Myceldecke erreichte eine Dichte bis zu 5 mm, und die etwas violett verfärbte Oberfläche erschien durch die kurz ausgebildeten Sporangienträger:

¹ M. Blinc u. H. Krivic, Arch. f. Mikrobiol. 11, 391, 1941. — ² Siehe Fußnote Nr. 1.

und den daran haftenden Sporangien wie mit Mohn bestreut. Es ist wichtig, daß die Kolonien in das Substrat wachsen, da, wie gesagt, nur die Hyphen als Fettträger in Betracht kommen.

Als Kulturgefäße dienten uns flache, gläserne photographische Wannen in einer Größe von 24×32 cm, die wir während der Zucht mit entsprechenden Glasscheiben bedeckten. Wir beimpften 300 ccm der Würze mit den Sporen des auf Reis rein gezogenen *Mucor mucedo* und ließen die bedeckten Gefäße bei einer durch ein automatisches Schaltrelais konstant gehaltenen Temperatur von 25°C bei Lichtzutritt stehen. Die Wannen standen in einem verschlossenen Digestorium und waren außerdem mit Cellophanpapier bedeckt.

Nach 5 bis 7 Tagen hoben wir das Pilzfleisch aus den Glaswannen heraus, filtrierten es durch ein Filter, wuschen mit kaltem Wasser nach und quetschten mit einem Spatel die Pilzmasse aus. Da sich das Trocknen samt dem Filterpapier bei 105°C als nicht gut erwies, klatschten wir die auf dem Filter angesammelte Masse in ein gewogenes Wägegölchen ab und trockneten bis zur Gewichtskonstanz im Vakuum bei 30°C . Die Trockensubstanz wurde dann in einer Reibschale mit oder ohne Sand zu feinem Staub verrieben. Der Pilzstaub war dunkelgraubraun gefärbt und hatte einen eigenartigen Geruch, der im ersten Augenblick etwas aufdringlich war, bei näherer Überprüfung an Bisquitpulver erinnerte.

Zur quantitativen Gewinnung des Rohfettes wurde die jeweils geerntete Pilzmasse im Soxhletapparat mit Petroläther erschöpfend extrahiert und nach Vertreiben des Petroläthers im Vakuum bei 30°C getrocknet und gewogen. Das Rohfett hatte eine wachsgelbe Farbe, war fest und mit härteren Partikelchen durchsetzt. Der Geruch war angenehm fettartig.

In jeder Versuchsserie zogen wir den Pilz auf zehn Schalen.

Bei Abbruch des Versuchs war der Zucker noch nicht vollkommen verbraucht. Durch Titration nach *Auerbach-Bodländer* stellten wir die anfängliche und nach Abbrechen der Kultur die noch vorhandene Zuckermenge fest. Im allgemeinen wurden bis zu diesem Zeitpunkt 33 bis 45 % des ursprünglichen Zuckers umgesetzt. Aus einer Schale ernteten wir durchschnittlich 4,7 bis 5,5 g trockene Pilzmasse mit einem Fettgehalt von 6,5 %. Bei diesen Versuchen erhielten wir demnach je 100 g jodometrisch bestimmten verbrauchten Zuckers etwa 20 g trockene Pilzsubstanz oder 1,3 g Rohfett.

Das Rohfett wurde durch fraktioniertes Lösen in Petroläther in zwei Fraktionen zerlegt. Der Hauptanteil geht als erste Fraktion in Lösung; er ist bei gewöhnlicher Temperatur halbfest. Die zweite Fraktion ist bei 40°C noch fest. Die charakteristischen Zahlen sind in Tabelle I angegeben.

Die Reaktion auf Glyceride mit Schifferreagens ist positiv. Das Fett von *Mucor mucedo* gehört demnach in die gleiche Gruppe der Fette wie die Samenfette. Bedeutsam ist seine hohe Jodzahl, auffallend ist auch die hohe Säurezahl.

Tabelle I. Charakteristik des Fettes von *Mucor mucedo*.

	Leichtlöslicher Anteil	Schwerlöslicher Anteil
Säurezahl	107,7	96,7
Verseifungszahl	190,8	192,6
Esterzahl	83,1	95,9
Jodzahl	125,6	
Refraktion bei 40° C n	1,4695	
Refraktometerzahl	67,5	
Unverseifbar	6,1	

Die im Gange befindlichen Versuche haben die Anpassung der *Mucor mucedo* an die in unserem Lande verfügbare Sulfitablauge und eine ökonomischere Ausnutzung des Zuckers zum Ziele.

Herrn Prof. *M. Samec* danken wir für die Anregung zu dieser Arbeit und Herrn Prof. *S. Jenčič* für die Ratschläge hinsichtlich der Charakterisierung des Fettes.

Zusammenfassung.

1. Wir untersuchten das Wachstum von *Mucor mucedo* auf Dextrose, Saccharose, Galaktose, Lactose, Maltose, Dextrin, Stärke, Melasse und Würze bei Variation von Salzzusätzen, Temperatur und p_H .
2. Das Wachstumsoptimum liegt bei 20 bis 25° C und p_H 7.
3. Von den Zuckern waren Maltose und Dextrose am günstigsten, als ungünstig erwiesen sich Saccharose und Lactose.
4. Ein sehr gutes Substrat waren Würze und Melasse.
5. Wir erzielten bisher einen Ertrag von 6,5 % Rohfett.
6. Das Fett von *Mucor mucedo* ist durch eine hohe Jodzahl gekennzeichnet; es ähnelt Samenfetten.

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Deutschen
Karls-Universität in Prag.)

Über das Wirkstoffbedürfnis heterotropher Algen.

II. Mitteilung:

Aneurin als Wachstumsfaktor für Polyblepharidineen und weitere Chilomonaden.

Von Karl Ondratschek.

(Eingegangen am 13. Februar 1941.)

In der ersten Mitteilung dieser Arbeitenreihe wurde die Bedeutung des Aneurins (Vitamin B₁) für einen Vertreter der *Chilomonaden*, *Chilomonas paramaecium*, behandelt. Nachdem die Reinzüchtung weiterer *Chilomonas*-Arten geglückt war, wurden diese und einige *Polytomella*-Arten (*Polyblepharidineen*) auf ihr Wirkstoffbedürfnis hin untersucht.

Bezüglich der Versuchsanstellung, Zubereitung der Nährlösungen, Bestimmung des Trockengewichts u. ä. sei auf die 1. Mitteilung (Ondratschek, 1940, S. 241) verwiesen, wo alles Nötige gesagt wurde.

Eigene Versuche und ihre Ergebnisse.

1. Einfluß des physiologischen Zustandes des zur Beimpfung einer Versuchslösung verwendeten Zellgemisches auf das Ergebnis.

Die Notwendigkeit der Berücksichtigung des Lebenszustandes des zur Einsaat gelangenden Zellgemisches wurde bereits in der ersten Mitteilung ausführlich erörtert und durch einige Versuche bewiesen. Inzwischen wurden weitere 27 farblose Flagellaten auf ihre Total- und Partiärvariabilität hin untersucht (Ondratschek, 1941), worunter sich auch die hier behandelten Stämme befanden. Einzelheiten über aufgezeigte Befunde sowie über das Zellaussehen im Normalzustand können dort eingesehen werden. Ein Vertreter der hier behandelten Organismen wurde bereits in der angegebenen Arbeit (Ondratschek, 1940) untersucht. Aus verschiedenen Abweichungen im Verhalten einzelner Stämme erschien es hier geboten, sämtliche zur Verwendung gelangenden *Chilomonas*- und *Polytomella*-Arten daraufhin zu untersuchen, welchen Einfluß der Lebenszustand auf den Ausfall eines Versuchs nehmen kann.

Zu diesem Zweck wurde unsere Nährlösung L 25a (Zubereitung: in 10%iger Erdabkochung werden 0,1% Pepton *Vaillant* und 0,2% Na-Acetat gelöst, $pH = 6,5$) in eine größere Anzahl 150 ccm fassender Erlenmeyerkolben zu je 100 ccm abgefüllt und nach Sterilisierung je 30 Kolben mit Aufschwemmungen von im Normalzustand befindlichen Zellen beimpft. Im Abstand von 2 Tagen wurden je drei Kolben zur Bestimmung des

Trockengewichtes der Erntemenge verwendet. Eine ganz gleiche Versuchsreihe wurde dann mit degeneriertem Zellmaterial beimpft und ebenso alle 2 Tage die Erntemenge bestimmt.

Schon die ersten Bestimmungen (Tabelle I) zeigten ein bedeutend größeres Erntegewicht der mit Zellen im Normalzustand beimpften Versuche im Vergleich zu den mit relativ degenerierten Zellgemischen beschickten Parallelkulturen. Nach Abschluß der durch 20 Tage durchgeführten Bestimmungen zeigte sich eine, bei den verschiedenen Arten mehr oder minder starke, in jedem Falle aber deutlich bemerkbare größere Trockensubstanzbildung bei Verwendung eines im Normalzustand befindlichen Impfmateri als.

Tabelle I. Einfluß des Lebenszustandes auf die Trockensubstanzbildung. (Nachstehende Angaben sind Mittelwerte aus je drei Bestimmungen in mg/100 cem/2—20 Tagen.)

Art	Lebenszustand*	Versuchsdauer in Tagen						
		2	4	6	8	10	15	20
<i>Polytomella caeca</i>	N	3,7	7,6	15,9	20,9	22,8	22,9	22,3
	D	0,6	1,8	4,0	9,8	12,4	12,2	12,6
<i>Polytomella agilis</i>	N	3,2	6,7	16,7	20,1	21,3	21,2	21,1
	D	0,4	2,2	4,8	8,6	11,9	12,5	12,2
<i>Polytomella globosa</i>	N	3,6	7,4	15,7	21,0	23,8	23,4	22,8
	D	0,7	1,9	3,6	8,4	11,6	11,4	11,3
<i>Chilomonas oblonga</i>	N	4,2	9,7	18,4	30,3	32,1	32,6	31,2
	D	0,9	3,5	8,5	16,2	17,3	17,4	17,2
<i>Chilomonas longata</i>	N	3,3	8,4	16,7	31,4	34,0	33,9	32,9
	D	1,1	4,9	9,8	16,8	18,3	18,6	17,2
<i>Chilomonas paramecium</i>	N	2,8	9,6	17,3	31,5	33,0	32,7	31,0
	D	0,9	2,8	10,5	12,6	13,4	13,0	13,6
<i>Chilomonas globosa</i>	N	4,1	8,6	16,7	29,2	31,5	31,4	30,4
	D	1,6	3,8	7,2	14,4	18,3	18,9	18,8
<i>Chilomonas coniformis</i> ..	N	4,6	10,3	17,1	31,6	33,9	33,4	31,4
	D	1,5	5,1	10,6	16,5	17,8	17,6	18,0

* N = Normalzustand. D = Degenerationszustand.

In ähnlicher Weise wie in der ersten Mitteilung geschildert, wurde auch hier die Steigerung der Vermehrungsintensität durch wiederholtes Übertragen in frische Nährlösung quantitativ verfolgt. Von einer Wiedergabe der Befunde kann abgesehen werden, da die angestellten Versuche im wesentlichen das gleiche Ergebnis hatten, wie jene bei *Chilomonas paramecium*, daß nämlich durch wiederholtes Übertragen eines anfänglich degenerierten Zellgemisches in frische Nährlösung das Organismengemisch immer homogener wird, die Vermehrungsintensität stetig ansteigt, bis sich schließlich jede Zelle im Normalzustand befindet. Das äußert sich in einem allmählichen Ansteigen der Ernteerträge.

2. Einfluß der Impfmenge und des Volumens der Nährlösung auf das Versuchsergebnis.

In ähnlicher Weise wie bei *Chilomonas paramaccium* zeigte sich auch bei den übrigen hier untersuchten *Chilomonas*-Arten und ebenso bei sämtlichen *Polyblepharidineen*, daß die Impfmenge nur unbedeutenden Einfluß auf die Höhe des endgültigen Ernteertrages nimmt. Die Versuche mit den verschiedenen Organismen verliefen gleichartig. In Tabelle II sind einige Ergebnisse zur Erläuterung des Gesagten zusammengestellt.

Tabelle II. Einfluß der Impfmenge auf die Trockensubstanzbildung. (Nachstehende Angaben sind Mittelwerte aus drei Bestimmungen in mg/100 ccm/12 Tagen.)

Art	Impfmenge			
	0,01 ccm	0,05 ccm	0,1 ccm	0,5 ccm
<i>Polytomella caeca</i>	22,7	23,2	24,0	23,5
<i>Polytomella agilis</i>	20,0	19,9	21,2	21,2
<i>Polytomella globosa</i>	21,8	21,6	24,2	23,6
<i>Chilomonas oblonga</i>	35,3	35,2	35,0	34,4
<i>Chilomonas longata</i>	31,0	31,6	32,1	32,5
<i>Chilomonas globosa</i>	35,6	35,4	36,5	36,4
<i>Chilomonas confiformis</i>	33,1	33,6	34,2	34,0

In der bereits eingangs erwähnten ersten Mitteilung wurde ausführlich die Versuchsanordnung zur Prüfung der Frage des Einflusses von Volumen und Gesamtkonzentration der Nährsalze einer Versuchslösung auf die Trockensubstanzproduktion geschildert. In gleicher Weise wurden auch mit den hier zu behandelnden Organismen diese Versuche durchgeführt. In allen Fällen verhielten sich diese Arten ebenso wie *Chilomonas paramaccium*. Die Verwendung von 250 ccm Nährlösung in der gebräuchlichen Konzentration (s. S. 46) in 300 ccm fassenden Erlenmeyerkolben mit engem Hals stellt die für die Trockensubstanzbildung relativ günstigste Versuchsanordnung dar.

3. Untersuchung des Einflusses von Aneurin auf die Vermehrung.

Die ersten Versuche dieser Versuchsreihe mußten sich zwangsläufig mit der Feststellung der Notwendigkeit oder Entbehrlichkeit des B₁-Vitamins für unsere heterotrophen Flagellaten befassen. Bei positivem Ausfall dieser Versuche war der Einfluß des Aneurins auf die Trockensubstanzbildung näher zu untersuchen.

Zur Verwendung gelangten die folgenden Nährlösungen, welche derart bereit wurden, daß zu einer Grundlösung von: 0,01 % MgSO₄, 0,01 %

K_2HPO_4 , 0,001% $CaCl_2$, 0,0001% $FeCl_3$ die folgenden Kohlenstoff- und Stickstoffquellen zugesetzt wurden:

Nährlösung A:	0,2%	Na-Acetat	und	0,1%	Pepton Vaillant;	$p_H = 6,5$
„	B: 0,2%	„	„	0,1%	Glykokoll;	$p_H = 6,6$
„	C: 0,2%	„	„	0,1%	Asparagin;	$p_H = 6,5$
„	D: 0,2%	„	„	0,1%	NH_4NO_3 ;	$p_H = 6,8$
„	E: 0,2%	„	„	0,1%	KNO_3 ;	$p_H = 6,5$
„	F: 0,2%	„	„	0,1%	NH_4Cl ;	$p_H = 6,7$
„	G: 0,2%	NH_4 -Acetat;			$p_H = 6,6$.	

Die Konzentration der einzelnen Stickstoffquellen wurde mit Ausnahme des Pepton Vaillant so gewählt, daß in allen Fällen die gleiche Menge an berechnetem N zugesetzt wurde. In der obigen Aufstellung bedeutet also z. B. 0,1% KNO_3 , daß 0,1 g KNO_3 -Stickstoff auf 100 ccm Nährlösung zugesetzt wurde. Für jeden Organismus wurden je sechs Kolben mit 250 ccm der oben angegebenen Nährlösungen A—G beschickt, sterilisiert und anschließend mit Zellen im Normalzustand beimpft, wobei drei Kolben einen Zusatz von 10^{-6} % Aneurin erhielten, während die drei anderen Kolben ohne Wirkstoffzusatz blieben.

Die nach 14—17 Tagen durchgeführten Trockengewichtsbestimmungen hatten das folgende Ergebnis:

Nährlösung A (Pepton-Vaillant als Stickstoffquelle): Die erläuternden Zahlen sind in Tabelle III zusammengestellt. Das normale, nicht weiter vorbehandelte Pepton-Vaillant bietet für alle untersuchten Arten genügend Wirkstoffe; ein Unterschied in der Größe der Ernterträge der aneurinhaltigen und aneurinfreien Kulturversuche besteht nicht. Wird hingegen ein durch dreimaliges Ausschütteln einer 10 %igen Peptonlösung mit Carbo medicinalis Merek von Wirkstoffen befreites Präparat als N-Quelle zugesetzt, so zeigt sich auch in diesem Falle eine kräftige Aneurinwirkung.

Tabelle III. Trockensubstanzbildung bei Pepton Vaillant als Stickstoffquelle.

(Mittelwerte aus drei Bestimmungen in mg/250 ccm/15 Tagen.)

Organismen	Unbehandeltes Pepton			Mit Carboraffin ausgeschütteltes Pepton		
	mit Aneurin	ohne Aneurin	Faktor	mit Aneurin	ohne Aneurin	Faktor
<i>Polytomella caeca</i>	68,1	66,9	1,02	65,8	1,0	65,8
<i>Polytomella agilis</i>	65,4	63,5	1,03	68,5	1,1	64,3
<i>Polytomella globosa</i>	68,2	67,8	1,01	67,5	1,2	56,3
<i>Chilomonas oblonga</i>	103,2	97,3	1,06	101,7	1,2	85,0
<i>Chilomonas longata</i>	99,9	97,8	1,02	105,8	1,4	75,6
<i>Chilomonas globosa</i>	104,9	100,5	1,04	106,6	1,4	76,1
<i>Chilomonas coniformis</i> ..	111,9	110,5	1,01	111,3	2,2	50,6

Nährlösung B und C (Aminosäuren als Stickstoffquellen): In Tabelle IV werden die zugehörigen Ergebnisse der Trockengewichts-

Tabelle IV.

Trockensubstanzbildung bei Aminosäuren als Stickstoffquellen.
(Mittelwerte aus drei Bestimmungen in mg/250 ccm/17 Tagen.)

Organismen	Glykokoll			Asparagin		
	mit Aneurin	ohne Aneurin	Faktor	mit Aneurin	ohne Aneurin	Faktor
<i>Polytomella caeca</i>	65,8	0,7	94,0	65,2	0,6	108,7
<i>Polytomella agilis</i>	68,8	0,6	114,7	63,6	0,7	90,8
<i>Polytomella globosa</i>	70,3	0,7	100,3	66,9	0,6	111,3
<i>Chilomonas oblonga</i>	103,4	1,1	94,0	95,2	1,0	95,2
<i>Chilomonas longata</i>	104,5	1,1	95,0	96,4	0,9	107,1
<i>Chilomonas globosa</i>	107,2	1,3	82,5	99,8	1,1	90,8
<i>Chilomonas coniformis</i> ..	109,9	1,3	84,5	103,8	1,1	94,4

bestimmungen auszugsweise wiedergegeben. Die in der I. Mitteilung aufgezeigte Tatsache, daß Glykokoll- und Asparaginpräparate mit der Handelsbezeichnung „chemisch rein“ genügend Wirkstoffe besitzen, um die Vermehrung farbloser Flagellaten zu ermöglichen, konnte auch hier bestätigt werden. Sämtliche *Chilomonas*- und *Polytomella*-Arten vermehren sich in einer Lösung, die nur Natriumacetat und Glykokoll bzw. Asparagin enthält, zufriedenstellend. Wird jedoch der Wirkstoffgehalt durch wiederholtes Umkristallisieren entfernt, dann tritt auch hier die Rolle des Aneurins als Wachstumsfaktor deutlich in Erscheinung. Die Ernteerträge aneurinfreier Kontrollversuche stellen höchstens 1 % der mit Aneurinzusatz erzielten dar.

Nährlösung D (NH_4NO_3 als Stickstoffquelle): In Tabelle V sind die Ergebnisse der Trockengewichtsbestimmungen vereinigt. Besondere Bedeutung kommt diesen Versuchen bei, die zeigen sollten, in welchem Maße die hier untersuchten *Polytomella*- und *Chilomonas*-Stämme imstande sind, ihren Stickstoffbedarf aus anorganischen Quellen zu decken und inwieweit sie bei dieser Assimilation anorganischen Stickstoffs eines Wirkstoffes bedürfen. Es schien zweckmäßig, bei den ersten Versuchen in dieser Richtung Ammonstickstoff neben Nitratstickstoff zu bieten, zu welchem Zwecke NH_4NO_3 als N-Quelle

Tabelle V. Trockensubstanzbildung bei NH_4NO_3 als Stickstoffquelle. (Mittelwerte aus drei Bestimmungen in mg/250 ccm/15 Tagen.)

Organismen	Mit Aneurin	Ohne Aneurin	Faktor
<i>Polytomella caeca</i>	55,2	0,5	110,4
<i>Polytomella agilis</i>	59,4	0,5	118,8
<i>Polytomella globosa</i>	55,9	0,4	139,7
<i>Chilomonas oblonga</i>	92,0	0,8	115,0
<i>Chilomonas longata</i>	97,2	0,8	121,5
<i>Chilomonas globosa</i>	90,5	0,8	113,1
<i>Chilomonas coniformis</i>	96,5	0,7	137,9

zur Verwendung gelangte. In allen Fällen stellte diese Verbindung eine voll auswertbare Stickstoffquelle dar. Hier zeigte sich auch am deutlichsten die Bedeutung des Aneurins als Wachstumsfaktor für sämtliche hier untersuchten heterotrophen Flagellaten.

Nährlösung E und F (KNO_3 bzw. NH_4Cl als Stickstoffquellen): In Tabelle VI sind die zugehörigen Erntegewichte und Vermehrungsfaktoren zusammengestellt. Es schien notwendig, in einer besonderen Versuchsreihe die Bedeutung der beiden Komponenten des Ammonnitrats bezüglich ihrer Eignung als Stickstoffquellen für unsere Flagellatenstämme näher zu untersuchen. Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, steht der Ammonstickstoff in keiner Weise dem NH_4NO_3 -N nach. Das Verhalten einzelner Stämme einem Nitrat gegenüber ist nicht ganz einheitlich. Während die *Chilomonas*-Arten instande sind, Nitrate zu verwerten, wenngleich in schwächerem Maße als Ammonverbindungen, können die *Polytomella*-Stämme den Nitratstickstoff nur in geringem Maße ausnutzen. Auch bei Verwendung von Nitrat als N-Quelle besteht die Notwendigkeit eines Wachstumsfaktors.

Tabelle VI. Trockensubstanzbildung bei Ammon- und Nitratstickstoff als Stickstoffquellen. (Mittelwerte aus drei Bestimmungen in mg/250 ccm/15 Tagen.)

Organismen	Ammonstickstoff			Nitratstickstoff		
	mit Aneurin	ohne Aneurin	Faktor	mit Aneurin	ohne Aneurin	Faktor
<i>Polytomella caeca</i>	50,2	0,5	100,4	6,8	—	—
<i>Polytomella agilis</i>	51,3	0,4	128,2	10,2	—	—
<i>Polytomella globosa</i>	50,5	0,6	84,1	7,5	—	—
<i>Chilomonas oblonga</i>	86,2	0,8	107,7	43,0	0,5	86,0
<i>Chilomonas longata</i>	88,4	0,8	110,5	39,0	0,5	86,0
<i>Chilomonas globosa</i>	84,6	0,9	94,0	41,0	0,6	69,8
<i>Chilomonas coniformis</i> ..	90,2	0,9	100,2	36,5	0,5	73,0

Berechnen wir in der üblichen Weise den Vermehrungsfaktor $\left(\frac{\text{Trockengewicht der wirkstoffhaltigen Kultur}}{\text{Trockengewicht der wirkstofffreien Kultur}} \right)$, so sehen wir, daß der Vermehrungsfaktor der *Chilomonaden* in bezug auf KNO_3 nur um ein geringes kleiner ist als bei NH_4Cl . Bei den *Polytomella*-Arten ist der Vermehrungsfaktor nicht zu berechnen, da aneurinfreie Kontrollen überhaupt keine Ernte liefern.

Nährlösung G (Ammonacetat als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle): Tabelle VII zeigt das Ergebnis. Unter Beachtung der in einer vorangegangenen Arbeit (*Ondratschek*, 1940, S. 251) geschilderten Vorsichtsmaßregeln stellt Ammonacetat eine Verbindung dar, welche durchaus den C- und N-Bedarf aller hier untersuchten Flagellaten zu

decken in stande ist. Infolge seiner einfachen Zusammensetzung und seiner großen Wirkstofffreiheit zeigt es besonders deutlich die Rolle des Aneurins als Wachstumsfaktor.

Tabelle VII. Trockensubstanzbildung bei Ammonacetat als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle.

(Mittelwerte aus drei Bestimmungen in mg/250 ccm/17 Tagen.)

Organismen	Mit Aneurin	Ohne Aneurin	Faktor
<i>Polytomella caeca</i>	61,0	0,6	101,7
<i>Polytomella agilis</i>	59,0	0,6	98,3
<i>Polytomella globosa</i>	61,1	0,7	87,3
<i>Chilomonas oblonga</i>	105,4	1,1	95,8
<i>Chilomonas longata</i>	99,6	0,9	110,7
<i>Chilomonas globosa</i>	97,1	0,9	107,9
<i>Chilomonas coniformis</i>	106,2	1,0	106,2

4. Untersuchung der Beziehungen zwischen der Konzentration der Nährsalze und der Trockensubstanzproduktion.

Die im dritten Abschnitt (S. 49) angegebene Nährlösung D wurde für die einzelnen Versuchsgruppen derart abgeändert, daß jeweils ein Bestandteil in seiner Konzentration variiert wurde.

Um in der folgenden Besprechung der Versuchsergebnisse die Übersichtlichkeit durch das etwas umfangreiche Zahlenmaterial nicht zu beeinträchtigen, wird abweichend von der in der I. Mitteilung üblichen Art, hier nur jeweils eine Trockengewichtsangabe wiedergegeben, die den Mittelwert aus drei Bestimmungen darstellt.

Tabelle VIII. Einfluß verschiedener Konzentrationen von Natriumacetat auf die Trockensubstanzbildung. (Mittelwerte aus drei Bestimmungen in mg/250 ccm/15 Tagen.)

Na-acetat in %	<i>Polytomella caeca</i>	<i>Polytomella agilis</i>	<i>Polytomella globosa</i>	<i>Chilomonas oblonga</i>	<i>Chilomonas longata</i>	<i>Chilomonas globosa</i>	<i>Chilomonas coniformis</i>
1,00	58,2	59,1	58,4	94,7	95,0	90,8	93,1
0,75	57,6	60,0	58,9	94,3	95,2	90,1	92,5
0,50	58,6	59,5	59,9	94,4	94,8	89,5	92,9
0,25	60,2	60,8	61,0	96,3	99,8	92,6	96,9
0,10	61,2	61,4	61,6	106,3	107,9	102,2	107,9
0,075	61,5	61,0	61,2	106,2	108,6	101,2	107,2
0,050	59,9	59,2	60,1	105,7	108,9	100,4	106,3
0,025	23,8	25,2	22,6	35,8	31,2	34,6	32,2
0,010	10,0	9,2	11,1	17,4	15,1	14,5	15,8
0,0075	3,1	2,5	3,9	5,0	4,6	4,9	5,2
0,0050	0,2	0,1	0,2	0,6	0,4	0,4	0,3
0,0025	—	—	—	—	—	—	—
0,0010	—	—	—	—	—	—	—
Ohne Acetat	—	—	—	—	—	—	—

Na-Acetatkonzentration und Ernteertrag: Tabelle VIII gibt einige der gefundenen Werte wieder. Der Na-Acetatgehalt der Lösung D wurde von 0,001—0,1 % variiert. Die Versuche zeigten, daß die erste, quantitativ nur schwer zu erfassende Vermehrung bei einer Konzentration von 0,005 % Na-Acetat eintritt. Durch steigende Konzentration nimmt auch das jeweilige Trockengewicht der Ernte zu,

Tabelle IX. Einfluß der Stickstoff- und der Aneurinkonzentration auf die Trockensubstanzbildung. (Mittelwerte aus drei Bestimmungen in mg/250 ccm/16 Tagen.)

$\text{NH}_4\text{NO}_3\text{-N}$ in %	<i>Poly- tomella</i> <i>caeca</i>	<i>Poly- tomella</i> <i>agilis</i>	<i>Poly- tomella</i> <i>globosa</i>	<i>Chilomonas</i> <i>oblonga</i>	<i>Chilomonas</i> <i>longata</i>	<i>Chilomonas</i> <i>globosa</i>	<i>Chilomonas</i> <i>coniformis</i>
Aneurin = 10^{-6} %.							
10^{-1}	58,2	55,3	60,1	86,8	92,5	90,5	87,9
10^{-2}	62,9	60,5	63,8	98,5	105,6	103,1	99,8
10^{-3}	16,5	12,4	15,6	28,6	31,0	28,5	23,2
10^{-4}	5,8	3,5	4,8	8,2	10,5	10,0	6,8
10^{-5}	1,8	0,9	2,1	2,8	3,1	2,7	1,8
10^{-6}	0,6	0,3	0,5	0,9	0,8	0,6	0,4
Ohne NH_4NO_3	—	—	—	—	—	—	—
Aneurin = 10^{-7} %.							
10^{-1}	36,5	34,0	33,3	76,8	79,3	79,4	76,8
10^{-2}	40,6	33,9	41,2	81,2	90,5	85,6	86,4
10^{-3}	11,5	9,2	12,3	26,2	28,5	25,3	23,8
10^{-4}	2,2	1,8	2,3	4,6	5,1	4,7	4,2
10^{-5}	0,4	0,3	0,6	0,8	1,1	0,8	0,5
Ohne NH_4NO_3	—	—	—	—	—	—	—
Aneurin = 10^{-8} %.							
10^{-1}	16,5	14,1	15,9	38,6	40,6	41,5	39,6
10^{-2}	19,8	18,2	20,2	40,2	43,9	42,8	42,6
10^{-3}	6,5	4,9	6,8	12,8	14,5	12,8	13,9
10^{-4}	1,2	0,8	1,3	1,5	2,6	2,5	2,3
10^{-5}	0,2	0,1	0,3	0,4	0,3	0,5	0,3
Ohne NH_4NO_3	—	—	—	—	—	—	—
Aneurin = 10^{-9} %.							
10^{-1}	8,6	7,2	8,8	18,1	20,2	18,9	21,0
10^{-2}	11,5	9,1	10,8	20,2	21,6	20,9	22,3
10^{-3}	4,1	2,5	3,8	4,8	5,6	6,2	5,5
10^{-4}	0,2	0,1	0,4	0,8	0,6	0,9	0,5
Ohne NH_4NO_3	—	—	—	—	—	—	—
Aneurin = 10^{-10} %.							
10^{-1}	2,4	1,8	2,2	4,3	3,8	3,5	4,6
10^{-2}	2,5	1,6	2,3	4,0	1,6	2,1	3,9
Ohne NH_4NO_3	—	—	—	—	—	—	—

bis schließlich bei 0,1 % Acetat der Höhepunkt erreicht ist. Stärkere Konzentrationen erlauben zwar noch Vermehrung, doch werden die Erträge mit zunehmendem Acetatgehalt geringer.

Stickstoffkonzentration und Ernteertrag. Ausführliche Untersuchungen wurden zur Klärung der Beziehungen zwischen Stickstoffkonzentration, Aneurin- und Erntehöchst-ertrag angestellt. Sie erschienen deshalb geboten, weil Aneurin als Wachstumsfaktor nach zahlreichen Untersuchungen (s. Schopfer, 1939) in besonders enger Beziehung zur Assimilation des Stickstoffs steht. Die Ergebnisse finden sich in Tabelle IX.

Die Einwaage des NH_4NO_3 geschah in einer von der bisherigen Art abweichenden Weise dadurch, daß der N-Gehalt des NH_4NO_3 als Vergleichsbasis gewählt wurde. Die folgenden Zahlen bedeuten also nicht Anzahl % NH_4NO_3 , sondern % Stickstoff!

Tabelle IX zeigt die Gültigkeit der von Schopfer für Pilze aufgezeigten Gesetzmäßigkeiten auch für *Chilomonaden* und *Polyblepharidineen*. Der Ernteertrag erwies sich als eine gesetzmäßige Folge der vorhandenen Aneurin- und Stickstoffmenge.

Günstigste Konzentration der Mineralsalze. Zahlreiche Versuche wurden angestellt, um durch Veränderung der Konzentration der einzelnen Mineralsalze deren günstigste Größenordnung festzustellen. Diese ganze Versuchsreihe brachte gegenüber den Befunden an *Chilomonas paramecium* (s. I. Mitteilung) kein wesentlich neues Ergebnis, so daß von einer näheren Darstellung des Verlaufs der diesbezüglichen Versuche abgesehen werden kann. Zusammenfassend sei gesagt, daß die im folgenden angegebenen Konzentrationen für alle untersuchten Organismen günstigste Wirkung haben. Es sind dies: MgSO_4 0,01 %; K_2HPO_4 0,01 %; CaCl_2 0,001 %; FeCl_3 0,0001 %.

5. Der Einfluß verschiedener Aneurinkonzentrationen auf die Teilungsfrequenz und auf die Trockensubstanzbildung.

Zur Verwendung gelangt in allen Fällen die im ersten Abschnitt in ihrer Zusammensetzung näher angegebene Nährlösung D. Die ersten zur Untersuchung der obigen Frage angestellten Versuche wurden in Röhrchen, die mit je 10 ccm Nährlösung beschickt waren, durchgeführt.

Die durch mehrere (bis fünf) Passagen mit ständig frischer Nährlösung durchgeführten Versuche zeigten folgendes: Die Beigabe von Aneurin zur Nährlösung in Konzentrationen zwischen 10^{-3} % (= 1 mg B_1 auf 100 ccm) und 10^{-6} % (= 1 γ B_1 auf 100 ccm) haben, gemessen an der Zunahme der Zellzahl in cmm, ungefähr den gleichen vermehrungsfördernden Einfluß. Die drei *Polytomella*-Arten weisen bei Züchtung mit diesen Aneurinkonzentrationen in 10-ccm-Kulturen 2200 bis 2500 Zellen im cmm auf, die vier untersuchten *Chilomonas*-Stämme 1800

bis 2100. Mit abnehmendem Aneurin Gehalt sinkt die Zellzahl ständig, bei $10^{-8}\%$ finden sich 1500 bis 1800 *Polytomella*-Zellen bzw. 1000 bis 1200 *Chilomonas*-Zellen im cmm, bei $10^{-10}\%$ nur mehr 400 bis 600 Zellen beider Gattungen. Die Aneurinwirkung ist jedoch noch bei einer Konzentration von $10^{-12}\%$ nachweisbar, wo sich durchschnittlich 150 *Polytomella*-Zellen und 100 *Chilomonas*-Individuen im cmm finden, während die vitaminfreien Kontrollkulturen nur 10 bis 20 Zellen im cmm aufweisen.

Die gleichen Versuche wurden weiter mit je 250 ccm Lösung in enghalsigen Erlenmeyerkolben durchgeführt, wobei als Maß für die ertragsteigernde Wirkung des Aneurins das Trockengewicht der Ernte, bzw. der Vermehrungsfaktor benutzt wurde. In der folgenden Tabelle X sind die wichtigsten Ergebnisse dieser Bestimmungen zusammengefaßt. Auf die Bekanntgabe verschiedener, weniger bedeutungsvoller Trockengewichtsbestimmungen wird verzichtet.

Tabelle X. Ernteerträge bei verschiedener Aneurinkonzentration.
(Mittelwerte aus drei Bestimmungen. *T* = Trockengewicht
in mg/250 ccm/15 Tagen, *F* = Vermehrungsfaktor.)

Organismen		Aneurinkonzentration in %								ohne
		10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	
<i>Polytomella caeca</i> ...	T	49,2	51,1	53,7	63,9	42,3	10,9	2,8	0,1	0,5
	F	98,4	102,0	107,2	128,0	84,6	21,8	5,6	2,2	—
<i>Polytomella agilis</i> ...	T	54,9	57,6	60,6	66,4	42,2	13,6	3,1	1,8	0,6
	F	91,5	59,9	101,0	110,8	70,4	22,7	5,2	3,0	—
<i>Polytomella globosa</i> ..	T	47,5	54,2	61,6	66,1	40,8	15,3	3,2	1,5	0,6
	F	79,2	90,4	102,6	110,2	68,2	25,5	5,3	2,5	—
<i>Chilomonas oblonga</i> ..	T	95,5	96,1	100,1	103,1	99,9	23,5	6,1	2,9	0,9
	F	106,1	106,8	111,2	114,6	111,0	26,2	6,8	3,2	—
<i>Chilomonas longata</i> ..	T	89,6	91,6	94,5	97,5	81,5	20,0	4,0	1,8	0,9
	F	99,5	101,8	105,0	108,2	90,5	22,2	4,5	2,0	—
<i>Chilomonas globosa</i> ..	T	93,3	95,3	95,9	101,3	76,8	19,2	3,7	1,3	1,0
	F	93,3	95,3	95,9	101,3	76,8	19,2	3,7	1,3	—
<i>Chilomonas coniformis</i> {	T	86,1	89,5	94,9	110,2	96,2	24,3	7,0	2,5	0,9
	F	95,6	99,4	105,6	122,6	107,0	27,0	7,8	2,8	—

Besprechung der Versuchsergebnisse.

In Fortsetzung und Erweiterung der mit der ersten Mitteilung dieser Arbeitenreihe begonnenen Untersuchungen über den Einfluß des Aneurins auf die Vermehrung bzw. Trockensubstanzproduktion heterotropher Flagellaten wurden vier weitere *Chilomonaden* sowie

drei *Polyblepharidineen* bezüglich ihres Wirkstoffbedürfnisses untersucht.

Einleitende Versuche zeigten die Bedeutung des Zellzustandes für das Versuchsergebnis auf. Nur Zellgemische, bei denen sich jede einzelne Zelle im Normalzustand befindet, gestatten eine einwandfreie Feststellung des Wirkstoffbedürfnisses. Nur solche, mit Zellen im Normalzustand angestellten Versuche liefern reproduzierbare Ergebnisse. Die Impfmenge erwies sich hier in gleicher Weise, wie bereits früher bei *Chilomonas paramaecium* gezeigt werden konnte, als ein für den endgültigen Ernteertrag ziemlich belangloser Faktor. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß Erntehöchstträge nur unter Bedingungen erzielt werden können, die einen regen Gaswechsel zwischen Kulturflüssigkeit und Außenmedium erschweren.

Nach Feststellung dieser, für die Durchführung der eigentlichen Untersuchungen als Voraussetzung notwendigen Verhältnisse, konnte die Analyse des Aneurineinflusses begonnen werden. Bei Verwendung einiger wirkstofffreier Stickstoffquellen, wobei von kompliziert zusammengesetzten Peptonen über Aminosäuren zu chemisch sehr einfach gebauten anorganischen Verbindungen geschritten wurde, konnte die Bedeutung des B₁-Vitamins eindeutig, und zwar für alle untersuchten Organismen, aufgezeigt werden. Aneurin stellt nicht einen stimulierenden Stoff dar, sondern ist für die Vermehrung unbedingt notwendig, muß also als Wachstumsfaktor bezeichnet werden.

Weitere ausgedehnte Versuche hatten die Untersuchung der Beziehung zwischen der Nährsalzkonzentration und der zugehörigen Trockensubstanzbildung zur Aufgabe. Es wurde gezeigt, daß einmal die Menge des assimilierbaren Acetats den Ernteertrag bestimmt, wobei eine Konzentration von 0,1–0,2 % das Optimum darstellt, daß aber ebenso die Stickstoffkonzentration maßgebenden Einfluß auf die Trockensubstanzbildung nimmt. In diesem Falle zeigt sich eine deutliche Gesetzmäßigkeit zwischen einer gegebenen Stickstoffkonzentration und der hierfür optimalen Aneurinmenge. Als günstigste Konzentration wurde für alle untersuchten Arten 10⁻² % Ammonnitrat-Stickstoff und 10⁻⁶ % Aneurin gefunden. Bezüglich des Aneurinoptimums zeigten sich kleine Verschiedenheiten unter den einzelnen Arten. *Polytomella caeca* zeigt ein scharfes Aneurinoptimum bei 10⁻⁶ %. *Polytomella agilis* und *P. globosa* liefern zwar auch bei 10⁻⁶ % Aneurin den größten Ernteertrag, doch ist eine Konzentration von 10⁻⁵ % fast ebenso wirksam. *Chilomonas oblonga* liefert bei Konzentrationen zwischen 10⁻⁵ und 10⁻⁷ % Aneurin nahezu die gleichen Erträge, *Ch. longata* nur zwischen 10⁻⁵ und 10⁻⁶ %, während *Ch. globosa* und besonders *Ch. coniformis* ein ausgesprochenes Optimum bei 10⁻⁶ % Aneurin haben.

Zusammenfassung.

Es konnte gezeigt werden, daß Aneurin für drei *Polyblepharidineen* (*Polytomella caeca*, *P. agilis*, *P. globosa*) und vier weitere *Chilomonaden* (*Chilomonas oblonga*, *Ch. longata*, *Ch. globosa* und *Ch. coniformis*) einen Wachstumsfaktor darstellt, der allein die Höhe der Trockensubstanzbildung bestimmt.

Bei sonst günstiger Zusammensetzung und Reaktion der Nährlösung beträgt die optimale Wirkstoffdosis 1 γ Aneurin je 100 ccm Lösung.

Literatur.

Ondratschek, K., diese Zeitschr. 11, 239, 1940. — Derselbe, Beih. z. bot. Centralbl. 61, Abt. A, 277, 1941. — Schopfer, W. H., Ergebn. d. Biol. 16, 1, 1939.

(Aus dem Institut für physiologische Botanik der Universität Upsala.)

Über die Wirkung von Biotin auf *Marasmius androsaceus* (L.) Fr.

Von

Gösta Lindeberg.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 17. Februar 1941.)

Seit Kögl und seine Mitarbeiter die „Bioskomponente“ Biotin isolieren konnten (Kögl, 1935, 1937; Kögl und Tönnis, 1936), sind verschiedene Arbeiten über den Einfluß dieser Substanz auf niedere Pflanzen veröffentlicht worden. Hier sollen nur die Untersuchungen erwähnt werden, die unter Verwendung von reinem Biotin in Form von Biotinmethylester aus Kögl's Laboratorium in Utrecht ausgeführt wurden.

Kögl selbst benutzte bei der Isolierungsarbeit als Testobjekt *Saccharomyces cerevisiae*, Rasse M, der, um eine synthetische Nährlösung assimilieren zu können, Zusatz von Biotin erfordert. Kögl und Fries stellten 1937 fest, daß *Nematospora gossypii* außer Meso-Inosit Biotin braucht, um eine synthetische Nährlösung zu assimilieren, und daß *Lophodermium pinastri* eine solche Nährlösung nur ausnutzen kann, wenn sie sowohl Aneurin als Biotin enthält. Zu dem gleichen physiologischen Typus, wie der letztgenannte Pilz, gehören auch *Valsa pini* und *Hypoxyylon pruinaum* (Fries, 1938). Dagegen fordert nach Hawker (1938) *Melanospora destruens*, um in einer synthetischen Nährlösung wachsen zu können, nur Zusatz von Biotin.

Die oben genannten Pilze sind alle *Ascomycetes*. Über die Wirkung des Biotins auf verschiedene mykorrhizabildende *Basidiomycetes* haben Melin und Lindeberg (1939) sowie Melin und Nyman (1940) Untersuchungen vorgenommen. Die untersuchten Pilze ließen sich alle in synthetischer Nährlösung mit Aneurin ohne Zusatz von Biotin züchten, wenn auch dieser Stoff in gewissen Fällen einen stimulierenden Einfluß auf das Wachstum hatte.

Unter den Bakterien wird *Staphylococcus aureus* bei Züchtung in synthetischer Nährlösung sehr stark gefördert, wenn diese außer Aneurin und Nikotinsäureamid noch Biotin enthält (v. Wagtendonk, 1937, Kögl und v. Wagtendonk, 1938). Endlich haben Nilsson, Bjälve und Burström, 1939, nachgewiesen, daß gewisse Stämme von *Bacterium radicum* für ihr Wachstum Biotin nötig haben.

Das Problem, ob Biotin nur die Wachstumsgeschwindigkeit beschleunigt oder ob es quantitativ in dem Sinne wirkt, daß eine gewisse Menge Biotin bloß die Bildung einer gewissen Mycelmenge zuläßt, hat von den genannten Forschern nur Fries (l. c.) behandelt. Bei seinen eingehenden Untersuchungen, die an *Nematospora gossypii* als Objekt stattfanden, erhielt er indes in dieser Beziehung keine eindeutigen Ergebnisse.

Im Jahre 1939 konnte ich mitteilen (Lindeberg, 1939), daß ein von mir untersuchter Hymenomycet, *Marasmius androsaceus* (L.) Fr., um

eine synthetische Nährlösung assimilieren zu können, Zusatz sowohl von Biotin als von Aneurin fordert und daß maximale Wachstumsgeschwindigkeit bei einer Biotinkonzentration zwischen 10 und 50 μg Biotin je 20 ccm Nährlösung erreicht wird. Um die Wirkung des Biotins auf den genannten Pilz näher zu untersuchen, wurden weitere Versuche mit suboptimalen Mengen Biotin in Form von Biotin-methylester aus dem Laboratorium von Prof. Dr. F. Kögl in Utrecht angestellt. Über die Ergebnisse dieser Versuche wird nachstehend kurz berichtet.

Die Nährlösung hatte bei diesen Versuchen folgende Zusammensetzung: Glykose 20 g; NH_4 -Tartrat 5 g; KH_2PO_4 1,0 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,5 g; FeCl_3 (1%ige Lösung) 10 Tropfen; ZnSO_4 -Lösung (Zn-Konz. 1/500) 0,5 ccm; Aneurin 50 μg ; Aqua dest. 1000 ccm. p_{H} nach Autoklavieren 5,5.

Jeder Kolben enthielt 20 ccm Nährlösung. Impfung, Wägung und p_{H} -Bestimmung erfolgten nach früher angegebenen Methoden (Lindenberg, l. c.). Die Punkte der Wachstumskurven wurden als Mittelwerte von sechs Parallelkulturen erhalten.

1. Biotin in den Konzentrationen von 1,0 und 2,0 μg je 20 ccm Nährlösung.

In Abb. 1 wird das Ergebnis eines Versuches dargestellt, der folgende Reihen umfaßte: I. Kontrolle: kein Biotinzusatz; II. 1,0 μg Biotin je Kolben; III. 2,0 μg Biotin je Kolben.

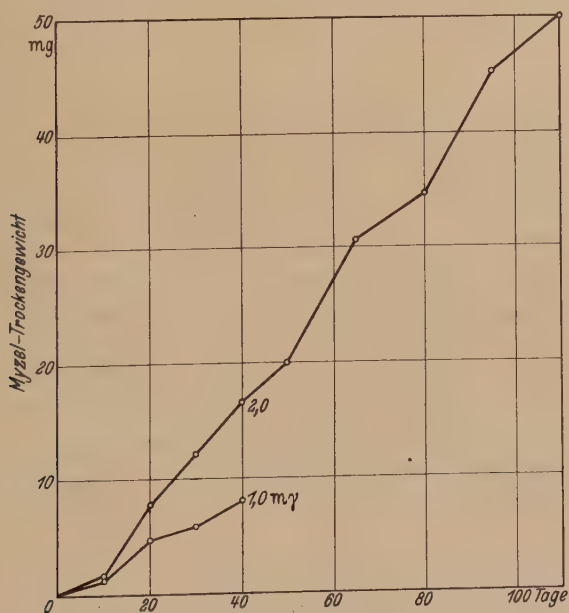


Abb. 1. Das Wachstum von *Marasmius androsaceus* in synthetischer Nährlösung mit 1,0 und 2,0 μg Biotin.

Bei der Kontrolle war noch nach 50 Tagen kein Wachstum zu bemerken (Myceltrockengewicht = 0,2 mg). In den Reihen mit Biotin war die Wachstumsgeschwindigkeit anfangs der zugesetzten Biotinmenge proportional. Nach längerer Versuchszeit als 40 Tagen ergaben sich indes Werte, welche zeigten, daß der Pilz sich in den beiden Reihen in prinzipiell verschiedener Weise verhielt. In Reihe III nahm das Wachstum normal seinen Fortgang, bis das Myceltrockengewicht nach 110 Tagen etwa 50 mg erreichte. In Reihe II wiesen indes die Werte der Myceltrockengewichte eine immer größere Streuung um die Mittelwerte auf. Um den Unterschied zwischen den beiden Reihen zu beleuchten, werden in Tabelle I als Beispiel die Einzelwerte nach 30 und 110 Tagen mitgeteilt nebst dem Mittelwert und der zugehörigen Schwankung.

Tabelle I. Der Einfluß von 1 und 2 my Biotin auf das Wachstum von *Marasmius androsaceus*.

Myceltrockengewichte (mg) nach 30 und 110 Tagen.

Versuchszeit 30 Tage		Versuchszeit 110 Tage	
1 my Biotin je Kolben	2 my Biotin je Kolben	1 my Biotin je Kolben	2 my Biotin je Kolben
6,8	14,4	34,0	54,8
6,0	13,0	28,5	54,5
5,7	12,0	23,8	49,5
5,5	11,4	15,4	49,0
5,5	11,4	9,7	46,8
5,0	10,7	6,7	46,5
5,8 ± 0,2	12,2 ± 0,5	(19,7 ± 4,4)	50,2 ± 1,5

Während sich die einzelnen Werte in jeder Reihe nach 30 Tagen und in Reihe III auch nach 110 Tagen ziemlich gut um den Mittelwert gruppieren, zeigen die entsprechenden Werte in Reihe II nach 110 Tagen eine abnorme Streuung. In dieser Reihe scheint das Mycel in einigen Kolben das Wachstum schon nach ungefähr einmonatiger Versuchszeit eingestellt zu haben, während es in anderen Kolben mit wechselnder Geschwindigkeit oder möglicherweise nach verschiedenen langen Pausen weitergewachsen ist. Tatsächlich konnten auch keine wirklichen Mittelwerte in dieser Reihe nach längerer Versuchszeit als 40 Tagen berechnet werden. Aus diesem Grunde konnte die Kurve in Abb. 1 nicht weiter als bis zum 40. Tage gezogen werden. Die Biotinkonzentration von 1 my je Kolben (1:20000000000) scheint also eine kritische Konzentration für den untersuchten Stamm von *Marasmius androsaceus* zu sein.

2. Biotin in den Konzentrationen von 0,2 und 0,5 my je 20 ccm Nährlösung.

Um auch den Einfluß noch kleinerer Biotinmengen zu untersuchen, wurde ein zweiter Versuch ausgeführt, dessen Ergebnis in Abb. 2 dar-

gestellt ist. Dieser Versuch umfaßte folgende Reihen: I. Kontrolle: kein Biotinzusatz; II. 0,2 m γ Biotin je Kolben; III. 0,5 m γ Biotin je Kolben; IV. 2,0 m γ Biotin je Kolben.

Auch bei diesem Versuch blieb alles Wachstum in den Kontrollkolben aus. Das Myceltrockengewicht in ihnen betrug nach 35 Tagen 0,2 mg und nach 88 Tagen 0,1 mg.

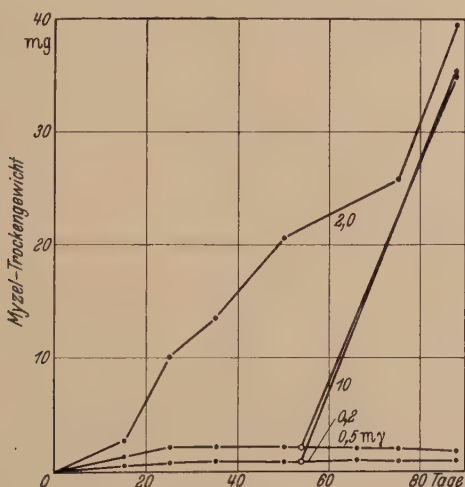


Abb. 2. Das Wachstum von *Marasmius androsaceus* in synthetischer Nährlösung mit 0,2, 0,5 und 2,0 m γ Biotin.

In den Reihen II und III wuchs der Pilz äußerst langsam. Nach ungefähr 1 Monat hörte das Wachstum bei einem Myceltrockengewicht von 0,9 bzw. 2,1 mg auf. Nach 54 Tagen wurden in je sechs Kolben aus einer jeden dieser beiden Reihen 10 ccm steriles Wasser mit 10 m γ Biotin gegeben. Allen übrigen Kolben wurden gleichzeitig 10 ccm steriles Wasser zugesetzt. Der Biotinzusatz hatte zur Folge, daß in den betreffenden Kolben sofort ein rasches Wachstum begann. Hieraus geht hervor, daß das Wachstum in diesen Reihen infolge von Biotinmangel zum Stillstand kam.

Das Wachstum in Reihe IV stimmte gut mit dem überein, welches in Reihe III (mit der gleichen Biotinkonzentration) bei dem vorigen Versuch erzielt worden war. Noch nach 3 Monaten, als das Myceltrockengewicht etwa 40 mg betrug, war keine Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit zu bemerken.

Zusammenfassung.

1. *Marasmius androsaceus* (L.) Fr. wurde in synthetischer Nährlösung mit Zusatz von Aneurin und wechselnden suboptimalen Mengen Biotin gezüchtet.

2. Wachstumskurven wurden in der Weise erhalten, daß der Mittelwert des Myceltrockengewichts in sechs Kolben in gewissen Zeitabschnitten bestimmt wurde.

3. Die Versuche haben meine früheren Ergebnisse bestätigt, daß der untersuchte Stamm von *M. androsaceus* eine synthetische Nährlösung mit Aneurin nicht assimilieren kann, wenn nicht auch Biotin zugesetzt wird.

4. Bei sehr schwachen Biotinkonzentrationen, 0,2–0,5 $\mu\gamma$ je 20 ccm Nährlösung, war die Wirkung des Biotins quantitativer Natur. Das Biotin wurde während des Wachstums verbraucht, und die gebildete Mycelmenge war der zugesetzten Biotinmenge proportional.

5. Bei etwas stärkeren Biotinkonzentrationen (1–2 $\mu\gamma$ je 20 ccm) herrschte keine Proportionalität zwischen der entstandenen Mycelmenge und der zugesetzten Biotinmenge.

Literatur.

- Fries, N., Symb. Bot. Ups. III, 2, Upsala 1938. — Hawker, L. E., Nature **142**, 1038, 1938. — Kögl, F., Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **68**, 1, 16, 1935. — Derselbe, Die Naturwissenschaften **25**, 465, 1937. — Kögl, F., u. N. Fries, Zeitschr. f. physiol. Chem. **249**, 93, 1937. — Kögl, F., u. B. Tönnis, ebenda **242**, 43, 1936. — Kögl, F., u. W. J. van Wagten donk, Rec. Trav. chim. Pays-Bas **57**, 747, 1938. — Lindeberg, G., Svensk Bot. Tidskr. **33**, 85, 1939. — Melin, E., u. G. Lindeberg, Bot. Notiser **1939**, S. 241. — Melin, E., u. B. Nyman, diese Zeitschr. **11**, 318, 1940. — Nilsson, R., G. Bjälfe u. D. Burström, Ann. Landw. Hochschule Schwedens **7**, 301, 1939. — Wagten donk, W. J. van, Een onderzoek naar de groeifactoren van *Staphylococcus aureus*. Diss. Utrecht 1937.

Sammelbericht.

{Aus dem Institut für Mikrobiologie der Landwirtschaftlichen Hochschule
Schwedens, Uppsala.}

Über die Bedeutung der Zellstruktur für den harmonischen Verlauf des Stoffwechsels in der Zelle¹.

Von

Ragnar Nilsson.

Mit 15 Textabbildungen.

(Eingegangen am 19. Februar 1941.)

Die Überschrift dieses Vortrages ist ja ziemlich umfassend. Nun ist es durchaus nicht meine Absicht, einen wenn auch nur einigermaßen erschöpfenden Bericht über das, was man auf diesem Gebiete weiß, oder zu wissen glaubt, zu erstatten. Dies wäre wohl auch ziemlich schwierig, wenn man das Problem, wie ich es hier tun will, vom biochemischen Gesichtspunkt aus betrachten wollte. Soweit ich finden kann, befinden wir uns hier noch auf schwankendem Boden und müssen uns im allgemeinen damit begnügen, mit reichlich verschwommenen Vorstellungen zu arbeiten.

Was ich hier vorlegen will, sind einige Beobachtungen, die uns vielleicht in einigen Punkten ein faßbareres Bild vermitteln könnten über die Art und Weise, in der die Zellstruktur auf das Zusammenspiel der biochemischen Reaktionen in der Zelle einwirkt. Das Versuchsmaterial, das dieser Schilderung zugrunde liegt, besteht einstweilen aus Untersuchungen über die Umsetzung des Zuckers in der Hefe-Zelle. Um einen Begriff darüber zu erhalten, inwieweit unseren Beobachtungen eine allgemeinere zellphysiologische Gültigkeit zukommt, sind wir jetzt damit beschäftigt, die Untersuchungen auch auf andere Zellen — Muskelzellen und verschiedene Mikroorganismen — auszudehnen.

Vorliegende Versuche sind teils in dem Mikrobiologischen Institut der Landwirtschaftlichen Hochschule und teils an der Abteilung für physiologische Chemie des *Wenner-Gren-Institutes* ausgeführt worden. In diesem Zusammenhang ist es mir ein Bedürfnis, Herrn Phil. Mag. *Frithiof Alm* für den großen Einsatz bei diesen Untersuchungen meinen besten Dank auszusprechen.

¹ Vortrag, gehalten in der Chemischen Gesellschaft zu Uppsala am 27. September 1940.

Der Gärverlauf in der lebenden Hefezelle ist dadurch gekennzeichnet, daß die Gärkurve so lange geradlinig verläuft, bis gegen Ende der Gärung infolge Substratmangels schließlich eine Krümmung eintritt (Abb. 1).

Wenn es sich darum handelt, eine Auffassung über die biochemischen Teilreaktionen zu erhalten, die sich während der Gärung in der lebenden

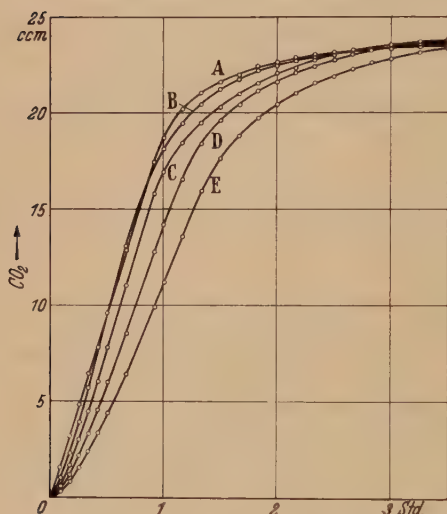


Abb. 1. Gärung durch lebende Hefe (Biochem. Zeitschr. 286, 257, 1936).

Zu jeder Gärungsprobe (Gesamtvolumen 2 ccm): 1 ccm Hefesuspension + 100 mg Glucose. In den Proben A, B, C, D und E 0 bzw. 0,25, 0,50, 0,75 und 1,00 ccm Phosphatlösung (0,67 mol.; $p_H = 6,4$; 0,84 ccm äquivalent mit 100 mg Glucose). Reaktionstemperatur 30°.

Zelle abspielen, ist es von un-
gemein großer praktischer Bedeu-
tung gewesen, daß es sich als un-
möglich gezeigt hat, den Charakter
dieses Gärverlaufs durch äußere
Einflüsse zu ändern. Bei der
Gärung mit lebenden Zellen führt
jeder Eingriff entweder dazu, daß
der Gärverlauf überhaupt nicht
beeinflußt wird, oder dazu, daß
die Gärgeschwindigkeit über die
ganze Gärkurve hin einheitlich
verändert wird. Eine Veränderung
der allgemeinen Form der Gär-
kurve tritt nicht ein, und es findet
also auch keine Aufteilung der
Gärung in verschiedenen Phasen
statt. Es werden auch keine
Zwischenprodukte des Zuckerab-
baues oder Umwandlungsprodukte
davon gespeichert. Aus Abb. 1
entnehmen wir z. B., daß ein Zu-
satz von Alkaliphosphat den Gär-

verlauf nicht grundsätzlich verändert. Bei der Gärung mit lebenden
Zellen verdient außerdem noch der Umstand erwähnt zu werden, daß
nach beendeter Gärung die entwickelte CO_2 -Menge nicht den Betrag er-
reicht, der theoretisch aus der zugesetzten Zuckermenge nach der
Gleichung von Gay-Lussac berechnet werden kann. In dem Fall, den
Abb. 1 zeigt, müßte die entwickelte Kohlensäuremenge 26,7 ccm betragen.
Ein Teil des Zuckers ist daher auf andere Weise als durch die nor-
male Alkoholgärung verbraucht worden. Ein kleiner Teil dieses Zucker-
defizits wird durch die kleinen Mengen Glycerin und Bernsteinsäure
gedeckt, die bekanntlich bei der Gärung gebildet werden. Zum Teil
muß aber das Zuckerdefizit darauf beruhen, daß ein Teil des Zuckers
auf bisher unbekannte Weise verschwunden ist. Es ist die Vermutung
ausgesprochen worden, daß dieses Verschwinden mit der Atmung der
Hefe zusammenhängen könnte. Bei unseren Versuchen haben wir aber

festgestellt, daß, gleichgültig ob die Gärung unter Stickstoff oder unter Luft durchgeführt wird, das gleiche Ergebnis erhalten wird. Die Erklärung muß demnach anders sein. Natürlich muß man immer mit der Möglichkeit eines Aufbaues von Zellsubstanz rechnen, der sich als Zuwachs von Hefe äußern würde. Im Hinblick auf die kurzen Versuchszeiten erscheint aber diese Deutung nicht überzeugend. Ich werde später auf diese Frage zurückkommen.

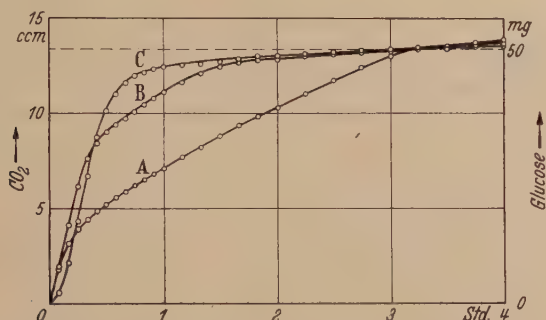


Abb. 2. Gärverlauf im Macerationssaft (Biochem. Zeitschr. **286**, 379, 1936).

Zu jeder Gärungsprobe (Gesamtvolumen 2 ccm): 1 ccm Macerationssaft + 100 mg Glucose + 0,1 ccm Zymophosphatlösung + 1 Tropfen 2,5 %ige Acetaldehydlösung.

In den Proben A, B und C 0 bzw. 0,25 und 0,50 ccm Phosphatlösung (0,67 mol., $p_H = 6,4$). Reaktionstemperatur 30°.

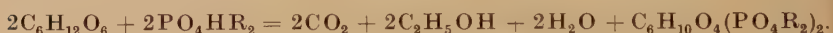
Auf Grund dieser Unbereitswilligkeit der lebenden Hefezelle, sich das Geheimnis ablocken zu lassen, wie sie in Einzelheiten verfährt, um aus Zucker Alkohol und Kohlensäure herzustellen, war es natürlich ein für die Gärungschemie vollständig unschätzbarer Einsatz, den *Buchner* leistete, als es ihm gelang, das gärende Prinzip aus der lebenden Zelle abzuschneiden und als eine homogene Lösung darzustellen, die mit der gewöhnlichen chemischen Untersuchungstechnik studiert werden konnte. Wie wir sehen werden, unterscheidet sich aber die Gärung, die von diesem homogenen System, also von der zellfreien Zymase geleistet wird, in sehr wichtigen Punkten höchst bedeutend von der Gärung, die von der lebenden Zelle bewirkt wird (Abb. 2).

Abb. 2 stellt den Gärverlauf in einem Hefemacerationssaft, also in einem vollständig strukturlosen Zymasesystem dar. Auf der Ordinate ist rechts der Zuckerverbrauch eingetragen, der sich nach der Gleichung von *Gay-Lussac*:



bei vollständiger Vergärung aus der entwickelten Kohlensäuremenge berechnen läßt. Dieses System bei der Behandlung des Bildmaterials werde ich im folgenden durchgehend verwenden.

Die Versuche wurden mit Gärmischungen ausgeführt, die von Anfang an verschiedene Mengen an freiem Phosphat enthielten, wobei deren Menge schrittweise von *A* bis *C* gesteigert wurde. Wie wir uns erinnern, hatte ein Zusatz von freiem Phosphat keinen Einfluß auf den Gärverlauf bei frischer Hefe. In dem strukturlosen Zymasystem herrschen, wie wir sehen, ganz andere Verhältnisse. Hier hat ein Zusatz von Phosphat eine vollkommen ausschlaggebende Bedeutung für den Verlauf der Gärung. Anfangs verläuft die Gärung in allen Versuchen rasch, aber nach einer gewissen Zeit biegt die Gärkurve ab, und die Gärgeschwindigkeit nimmt einen konstanten, bedeutend niedrigeren Wert an. Das Ausmaß dieser raschen Gärungsphase ist eine Funktion des Gehalts der Gärmischung an freiem Phosphat zu Beginn der Gärung. Nach *Harden* sollte diese Funktion wie folgt ausgedrückt werden können:



Wenn die Gärmischung von Anfang an eine dem Zucker äquivalente (äquimolekulare) Menge Phosphat oder einen Überschuß davon enthält, dürfte die *Hardensche* Gleichung tatsächlich gelten. Die Hälfte des Zuckers vergärt in diesem Falle rasch zu Alkohol und Kohlensäure, während die andere Hälfte als schwervergärbare Hexosediphosphorsäure festgelegt wird. (Kurve *C*). Analytisch läßt sich nachweisen, daß der gespeicherte Ester unter diesen Versuchsbedingungen tatsächlich aus Hexosediphosphorsäure besteht. Es geht ohne weiteres hervor, daß nach *Hardens* Gleichung höchstens die Hälfte des zugesetzten Zuckers rasch zu Alkohol und Kohlensäure vergoren werden kann. Die experimentelle Bestätigung von *Hardens* Gleichung ist in dieser Beziehung vollkommen. Wie auch die Zusammensetzung der Gärmischung verändert wird, wird in einem Macerationssaft nie mehr als höchstens die Hälfte des zugesetzten Zuckers rasch zu Alkohol und Kohlensäure vergoren.

Bei Unterschuß von Phosphat in der Gärmischung treten uns aber bedeutend kompliziertere Verhältnisse entgegen. Sonderbarerweise scheinen die eigentümlichen Verhältnisse in solchen Systemen der Aufmerksamkeit der Gärungskemiker bisher vollständig entgangen zu sein. Wahrscheinlich beruht dies darauf, daß der Knick, der in der Gärkurve am Ende der raschen Gärungsphase auftritt, auch in diesem Falle die *Hardensche* Gleichung befriedigt, wenn seine Lage aus der Menge freien Phosphats in der Gärmischung zu Beginn der Gärung berechnet wird. Diese Übereinstimmung ist aber, wie wir aus unseren Versuchen gesehen haben, nur formeller Art. Zwar ist alles Phosphat beim Knick verestert, doch besteht der Ester, der dann vorliegt, nicht aus der gewöhnlichen Hexosediphosphorsäure. Eine genauere Analyse

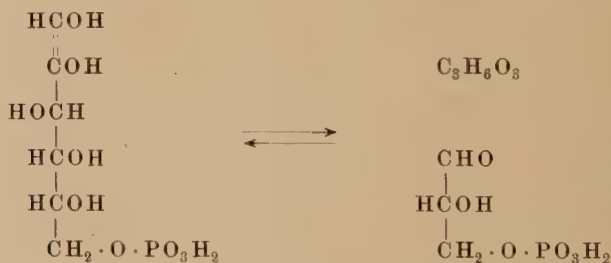
der Phosphorsäurebilanz entlang der Gärkurve zeigt eine Reihe Eigentümlichkeiten. So ist das Phosphat bedeutend früher, als der Knick auftritt, vollständig verestert. Der Ester, der anfangs und bis zum Knick vorhanden ist, ist ziemlich schwer hydrolysierbar und kann demnach nicht aus der gewöhnlichen Hexosediphosphorsäure bestehen. Nach dem Knick dauert die Gärung, wenn zwar mit bedeutend herabgesetzter, so doch immerhin mit einer nicht allzu unbedeutenden Geschwindigkeit fort.

Eine sehr bemerkenswerte Tatsache ist nun, daß die Gärung vollständig aufhört, wenn eine Kohlensäuremenge entwickelt ist, die der vollständigen Vergärung von genau der Hälfte der zugesetzten Zuckermenge entspricht. Dies wiederholt sich immer, und zwar vollkommen unabhängig von dem quantitativen Verhältnis zwischen Zucker und Phosphat in der Gärmischung und somit auch vollständig unabhängig von der Lage des ersten Knickes auf der Gärkurve. Die Gärungsphase, die also von den beiden Knicken der Gärkurve begrenzt wird, ist unter anderem dadurch gekennzeichnet, daß die Gärmischung keine anorganische Phosphorsäure enthält. Die gesamte Phosphorsäure ist während dieser ganzen Periode organisch gebunden. Analytisch läßt sich indessen nachweisen, daß im Verlauf dieser langsamen Gärung eine sukzessive Umwandlung der gebildeten Phosphorsäureester vor sich geht. Wir sind noch mit diesen Versuchen beschäftigt, aber allem Anschein nach scheint das Ergebnis zu werden, daß beim zweiten Knick der Gärkurve eine vollständige Umwandlung des bei dem ersten Knickpunkt vorliegenden unbekannten Esters bzw. der unbekannten Ester in die gewöhnliche Hexosediphosphorsäure abgeschlossen ist.

Dies alles scheint wohl ein recht sonderbares Ergebnis zu sein, wenn wir uns jetzt die Aufgabe stellen, quantitativ darüber Rechnung abzulegen, was während der Gärung aus dem Zucker geworden ist. Betrachten wir Kurve A, so sind beim zweiten Knick 50 % des Zuckers zu Alkohol und Kohlensäure vergoren worden, während ungefähr 25 % als schwervergärbare Hexosediphosphorsäure vorliegen. Die übrigen 25 %, für die aber eine Deckung fehlt, sind auf bisher unbekannte Weise verschwunden. Aus Zuckeranalysen, die in der Gärmischung nach Entfernung der Ester ausgeführt werden können, geht hervor, daß während der ersten Gärungsphase der Zucker sehr rasch verschwindet. Hiermit scheint das Verschwinden des anorganischen Phosphats vollständig parallel zu gehen. Zwischen den beiden Knicken der Gärkurve nimmt der Zuckergehalt schrittweise langsam ab, während schließlich beim zweiten Knick praktisch kein Zucker mehr vorhanden ist.

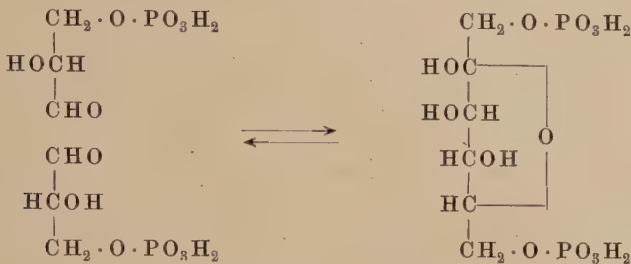
Bei unseren Versuchen, diese eigentümlichen Verhältnisse zu deuten, sind wir von der Auffassung ausgegangen, daß das Hexosemolekül aus zwei in bezug auf ihre Vergärbarkeit verschiedenartigen Hälften besteht. Es gibt vieles, was diese Auffassung unterstützt, doch würde es eine allzu große Abweichung von meinem Thema bedeuten, jetzt näher darauf einzugehen. Ich will mich daher jetzt damit begnügen, darauf hinzuweisen, daß diese Annahme uns die Möglichkeit gibt, die Tatsache, daß von dem strukturlosen Zymasesystem nur die Hälfte des zugesetzten Zuckers rasch vergoren werden kann, vernünftig zu erklären.

Ich werde jetzt kurz die Hypothese, oder sagen wir vielleicht lieber die Fiktion, vorlegen, die wir uns hinsichtlich gewisser Teilstadien der Gärung gemacht haben. Wir stellen uns also vor, daß das erste Stadium der Gärung in einer Phosphorylierung des Hexosemoleküls zu einer Hexosemonophosphorsäure besteht. Durch eine intramolekulare Oxydoreduktion, die durch die Cozymase vermittelt wird, wird diese intermediäre Hexosemonophosphorsäure zwischen dem 3. und 4. Kohlenatom aufgespalten, wobei wir auf diese Weise zwei Triosemoleküle erhalten, wovon das eine phosphoryliert und das zweite nicht phosphoryliert ist.



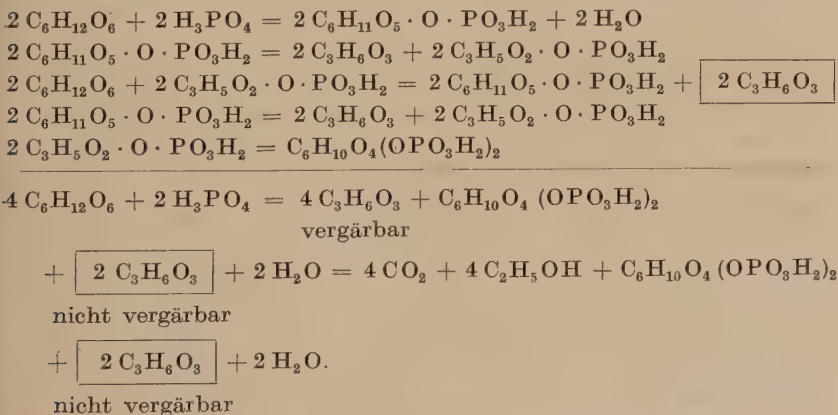
Auf diese Weise erhalten wir zwei verschiedenartige Hälften des Hexosemoleküls, die in bezug auf ihre Vergärbarkeit große Unterschiede zeigen können. Wir nehmen nun ferner an, daß die eine von diesen Hexosehälften — die nicht phosphorylierte — von allen, sowohl zellgebundenen als auch zellfreien, Zymasesystemen rasch vergoren werden kann. Für die phosphorylierte Triose dagegen — die nach unserer Diskussion durch eine Glycerinaldehydphosphorsäure dargestellt wird — gelten nicht die gleichen Voraussetzungen. In der lebenden Hefezelle muß sie rasch vergoren werden können, nicht dagegen von einem Macerationssaft. Bei Phosphatüberschuß in der Gärmischung stabilisiert sich ja in einem strukturlosen Zymasesystem die Hälfte des Zuckers als Hexosediphosphorsäure. Nach unserer Hypothese können wir dies erklären, wenn wir ferner annehmen, daß in einem solchen System die

Glycerinaldehydphosphorsäure sich zu Hexosediphosphorsäure kondensiert.



Was diesen Punkt betrifft, wird die Hypothese vollständig von den experimentell festgestellten Tatsachen bestätigt. Diese Kondensation findet tatsächlich statt. Was geschieht nun aber, wenn die Gärmischung Phosphat im Unterschuß enthält? Um dem überschüssigen Zucker eine Möglichkeit zur Vergärung zu geben, muß hier nach unserer Auffassung eine Phosphatumesterung von der Glycerinaldehydphosphorsäure auf das noch nicht angegriffene Hexosemolekül stattfinden. Dieses wird dadurch in Hexosemonophosphorsäure überführt, welche letztere in der vorher angegebenen Weise wiederum zerfällt und partiell vergoren wird. Die durch die Umesterungsreaktion dephosphorylierte Triosephosphorsäure ist aber nach unserer Hypothese eine Substanz, die von dem strukturlosen Zymasesystem nicht rasch vergoren werden kann. Sie ist die gesuchte unbekannte Substanz, die sich in dem früher erwähnten Zuckerdefizit zu erkennen gibt.

Die Hypothese hat den Vorteil, daß sie dem Gärverlauf quantitativ Rechnung trägt. In einem strukturlosen Zymasesystem, wo die Gärmischung von Anfang an z. B. doppelt so viele Hexosemoleküle wie Phosphorsäuremoleküle enthält, spielen sich folgende Teilreaktionen ab:



In einer solchen Gärmischung ist also bei dem zweiten Knick der Gärkurve die Hälfte des Zuckers zu Alkohol und Kohlensäure vergoren worden, während ein Viertel als schwervergärbare Hexosediphosphorsäure vorhanden ist. Dies stimmt also auch mit den experimentell gefundenen Verhältnissen überein. Das Zuckerdefizit, das somit bei dem zweiten Knickpunkt nicht weniger als ein Viertel der zugesetzten Zuckermenge beträgt, besteht aus einer unveresterten, nicht vergärbaren Substanz. Nach den hier entwickelten Vorstellungsweisen sollte sie aus einer Triose bestehen. Nichts verhindert gleichwohl, daß die primär gebildete Triose sekundären Umwandlungen ausgesetzt sein könnte. Unsere Untersuchungen sind in diesem Punkt noch nicht so weit gediehen, daß wir den chemischen Charakter der in Frage kommenden Substanz angeben könnten. Es will uns aber so scheinen, als ob in der Gärmischung eine Kondensation der primär auftretenden Substanz stattfindet. Bei dem zweiten Knick der Gärkurve sammelt sich nämlich in der Gärmischung eine phosphorfreie, nicht reduzierende Substanz an, die bei Erhitzung in $n\text{ H}_2\text{SO}_4$ ein stark reduzierendes Produkt gibt. Nach Versuchen zu beurteilen, die in letzter Zeit zusammen mit *M. Elander* ausgeführt wurden, findet unter diesen Versuchsbedingungen außerdem eine Kondensation vom Typus der Acyloinkondensation statt.

In diesem Zusammenhang kehren wir einen Augenblick zu den Verhältnissen bei der Gärung mit lebender Hefe zurück. Auch bei der Gärung mit lebender Hefe verschwindet ja, wie früher schon angedeutet wurde, ein — in diesem Falle zwar verhältnismäßig unbedeutender — Teil des Zuckers in bisher unbekannter Weise. Es fragt sich, ob diese Substanz, die wir jetzt bei der zellfreien Gärung suchen, vielleicht eine Erklärung auch für das Zuckerdefizit bei der normalen Gärung mit lebender Hefe geben kann. Wir sind zur Zeit mit der Bearbeitung auch dieser Frage beschäftigt.

Wie wir also gesehen haben, ist der Verlauf der Gärung in einem strukturlosen Zymasystem vollkommen anders als in der lebenden Hefezelle. Wie früher angedeutet wurde, entzieht sich aber der intermediäre Reaktionsverlauf bei der Gärung in der lebenden Zelle jeder direkten Beobachtung. Unter solchen Umständen ist es natürlich für die Entwicklung der Gärungschemie von der größten Bedeutung gewesen, daß man sich eine so genaue Kenntnis wie möglich über sämtliche Reaktionen, die sich in dem strukturlosen Zymasystem abspielen, verschafft hat. Was aber nach meiner Auffassung in bedenklicher Weise die weitere Entwicklung verriegelt hat, ist der Umstand, daß, wie es scheint, die Forschung sich allmählich auf das, was in diesem strukturlosen Zymasystem geschieht, blind gestarrt hat und den Gärverlauf, der hier zum Vorschein kommt, mit dem normalen Vorgang in der lebenden Hefezelle automatisch identifiziert hat. Teilweise dürfte dies

durch den Umstand zu erklären sein, daß die meisten Forscher auf diesem Gebiete den Gärverlauf mittels der hochempfindlichen und übrigens selbstverständlich ausgezeichneten mikromanometrischen Methode von *Warburg* verfolgt haben. Dies hat nämlich mit sich gebracht, daß die Substratmenge so klein gewählt werden mußte, daß das Zymasystem, das also in gewaltigem Überschuß in bezug auf alle teilnehmenden Faktoren vorhanden war, in keiner Beziehung sozusagen an die Grenze seiner Leistungsfähigkeit gestellt wurde, und daß einfach aus diesem Grunde auch eine Aufteilung des Gärverlaufs in verschiedene Gärungsphasen unterblieb. In der Literatur finden sich Beispiele von Gärungen, die in Macerationssaft mit dieser Methode ausgeführt wurden, bei denen zugesetzte gewöhnliche Glucose genau wie durch lebende Hefe quantitativ nach einer geradlinigen Gärkurve vergoren wurde.

Meiner Ansicht nach ist es für die fortgesetzte Forschung ferner von wesentlicher Bedeutung, daß man sich darüber klar wird, daß man bezüglich dieser Reaktionen, die man in strukturlosen Zymasystemen untersucht hat und noch immer untersucht, vielfach nur weiß, daß sie von den Enzymen der Hefe *zustande gebracht werden können*. Dagegen weiß man nicht, ob sie sich in der Reaktionskette der normalen Gärung in der lebenden Hefezelle *tatsächlich abspielen*. Man kann leicht Beispiele für Reaktionen finden, die sehr energisch von dem Zymasystem oder Teilfaktoren davon ausgeführt werden können, die aber nichtsdestoweniger unmöglich an dem Mechanismus der normalen Gärung beteiligt sein können. Um ein nahe zur Hand liegendes Beispiel zu nennen — die Reduktion von Methylenblau.

Immerhin muß doch wohl angenommen werden, daß wenigstens einige von den Gesetzmäßigkeiten, die man in bezug auf den intermediären Verlauf der Gärung in toten Zymasystemen hat feststellen können, eine grundlegende Bedeutung auch für den Verlauf der normalen Gärung in der lebenden Hefezelle haben. Die großen Abweichungen, die z. B. der Gärverlauf in einem Macerationssaft, verglichen mit dem Gärverlauf in der lebenden Hefezelle aufweist, dürften wohl dadurch entstanden sein, daß gewisse Teilreaktionen aus der normalen Reaktionskette entgleisen. Was wir jetzt suchen, ist die Kenntnis, wie die verschiedenen Teilreaktionen in der lebenden Zelle normal koordiniert werden. Um dies zu erreichen, ist es offensichtlich notwendig, in irgendeiner Weise eine Brücke zu schlagen zwischen den Erfahrungen, die bezüglich des Gärverlaufs einerseits in der lebenden Zelle und andererseits in den toten Zymasystemen gewonnen wurden.

Es ist nun deutlich, daß für den Stoffwechsel der lebenden Hefezelle die Permeabilitätsverhältnisse an der Zellmembran eine hervortretende Rolle spielen. Die Zelle bildet eine geschlossene Einheit, die in gewissen Beziehungen gegen die Umgebung, in der sie sich befindet, scharf

abgegrenzt ist. Stoffe, die auf den Gärverlauf in einem strukturlosen Zymasystem durchgreifend einwirken, können vollständig wirkungslos sein, wenn mit lebenden Zellen gearbeitet wird, einfach deswegen, weil der in Frage kommende Stoff infolge Permeabilitätshindernisse niemals in die Zelle hineingelangt. Es läßt sich nun denken, daß wenn diese Permeabilitätshindernisse beseitigt werden könnten, ohne daß dabei der enzymatische Apparat der Hefe irgendwelche Veränderungen erfährt, das intakte Zymasystem der lebenden Zelle dadurch für chemische Angriffe sozusagen bloßgelegt werden würde.

Es hat sich gezeigt, daß dieser Gedanke auf einfachste Weise verwirklicht werden kann und zwar dadurch, daß man die lebende Hefe unter schonenden Bedingungen einer so schnellen Trocknung unterwirft, daß sie in den trockenen Zustand überführt wird, bevor irgendwelche autolytischen Veränderungen haben eintreten können. Diese Trockenhefe, bei der also das Zymasystem der lebenden Hefe intakt ist, und die wir der Kürze halber als intakte Trockenhefe bezeichnen wollen, hat die bemerkenswerte Eigenschaft, daß sie ohne Phosphatzusatz zugesetzten Zucker *vollständig* nach einer geradlinigen Gärkurve vergärt. Sie vermag also eine Gärung zu bewirken, die den gleichen Typ hat wie die normale Gärung in der lebenden Zelle. Was diese intakte Trockenhefe vom experimentellen Gesichtspunkt aus so wertvoll macht, ist, daß sie sich zum Unterschiede von der lebenden Hefezelle durch verschiedenartige Eingriffe derartig beeinflussen läßt, daß der Gärverlauf — mehr oder weniger scharf ausgeprägt — in den Typ übergeht, der für das strukturlose Zymasystem charakteristisch ist. Die intakte Trockenhefe stellt also untersuchungstechnisch eine außerordentlich wertvolle Übergangsform zwischen dem strukturlosen Zymasystem und der lebenden Hefezelle dar.

Eine Veränderung des Gärverlaufs der intakten Trockenhefe der hier angedeuteten Art kann in gewissem Ausmaß schon dadurch erreicht werden, daß die Gärmischung mit erheblichen Mengen anorganischen Phosphats versetzt wird (Abb. 3).

Wie Kurve A zeigt, verläuft die Gärung in der intakten Trockenhefe *ohne* besonderen Zusatz von Phosphat in völlig gleichartiger Weise wie in der lebenden Hefe. Sehr wesentlich unterscheidet sich dagegen die lebende Hefe von der intakten Trockenhefe in den Versuchen *mit* Zusatz von Phosphat zur Gärmischung. Wie wir uns erinnern, hat Phosphatzusatz zu einer Gärmischung mit lebender Hefe nur einen sehr unbedeutenden Einfluß auf den Gärverlauf und verändert vor allem nicht grundsätzlich den Habitus der Gärkurve. Bei den Versuchen mit intakter Trockenhefe sind die Verhältnisse ganz anders. Bei schrittweise gesteigertem Phosphatzusatz tritt hier eine immer stärker betonte Hemmung der Gärgeschwindigkeit ein. Es ist dabei eine sehr auffällige

Tatsache, daß diese Hemmung erst in dem späteren Stadium der Gärung in Erscheinung tritt, und zwar dann, wenn ungefähr die Hälfte des Zuckers zu Alkohol und Kohlensäure vergoren ist. Wir stoßen also hier noch einmal auf diese Aufteilung des Zuckers in zwei vom Gesichtspunkt der Vergärbarkeit aus verschiedenartigen Hälften. Während wir die Vergärung der Hälfte der zugesetzten Zuckermenge durch Phosphat-

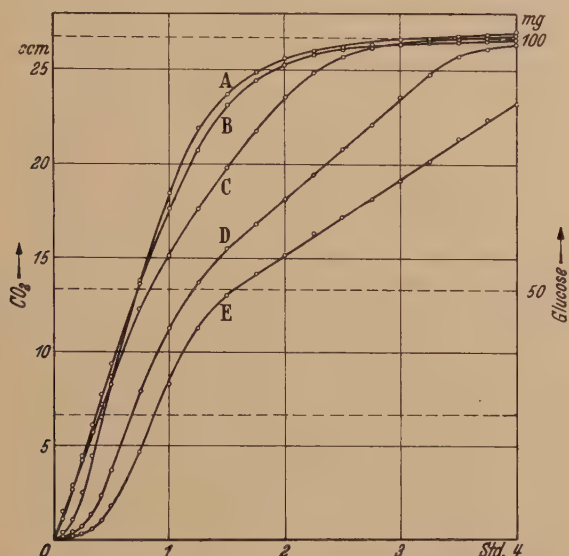


Abb. 3. Gärung durch Trockenhefe mit intaktem Zymasystem (Biochem. Zeitschr. 286, 258, 1936). In jeder Gärungsprobe (Gesamtvolumen 2 ccm): 200 mg intakte Trockenhefe + 100 mg Glucose + 0,1 ccm Zymophosphatlösung. In den Proben A, B, C, D und E 0 bzw. 0,25, 0,50, 0,75 und 1,00 ccm Phosphatlösung. (0,67 mol.; $p_H = 6,4$; 0,84 ccm äquivalent mit 100 mg Glucose.) Reaktionstemperatur 30°.

zusatz hemmen können, wird die Vergärung der anderen Hälfte dadurch praktisch nicht beeinflusst.

Wie wir uns erinnern, tritt auch in dem strukturlosen Zymasystem bei Überschuß von Phosphat in der Gärmischung ein Knick in der Gärkurve auf, und zwar in dem Augenblick, wo ungefähr die Hälfte des Zuckers zu Alkohol und Kohlensäure vergoren worden ist. In diesem letzteren Falle hat aber der Zusatz von Phosphat eine *Aktivierung* der Gärung bewirkt, und die rasche Vergärung der halben Zuckermenge, die dadurch erreicht wird, ist die beste Gärung, die überhaupt in diesem System erhalten werden kann. In dem intakten Zymasystem, das wir hier untersuchen, ist dagegen die Vergärung des Zuckers ohne Zusatz von Phosphat vollständig, und der Knick in der Gärkurve entsteht hier durch eine *Phosphathemmung*. Unsere Hypothese hilft uns auch in diesem Falle. Es ist ganz natürlich, daß die Vergärung des

intermediären Triosephosphats durch Phosphatzusatz gehemmt wird. Ein hoher Phosphatgehalt in der Gärmischung müßte die Dephosphorylierung des Triosephosphats erschweren und statt dessen seine Neigung erhöhen, sich zu Hexosediphosphorsäure zu kondensieren.

Wie aus Abb. 3 ersichtlich ist, läßt sich jedoch durch den bloßen Zusatz von Phosphat keine vollständige Umgestaltung des Gärverlaufs in den Typ, der in dem strukturlosen Zymasystem herrscht, bewirken.

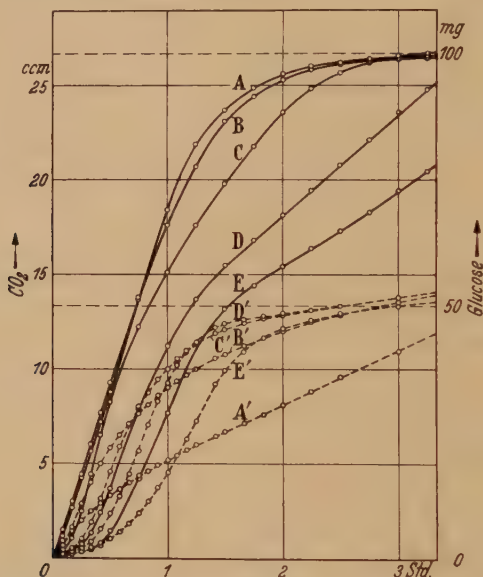


Abb. 4. Gärung durch intakte Trockenhefe mit und ohne Toluolzusatz (Biochem. Zeitschr. **286**, 383, 1936).

Zu jeder Gärungsprobe (Gesamtvolumen 2 ccm): 200 mg intakte Trockenhefe + 100 mg Glucose + 0,1 ccm Zymophosphatlösung.

In den Proben A, B, C, D und E 0 bzw. 0,25, 0,50, 0,75 und 1,00 ccm Phosphatlösung (0,67 mol., $p_H = 6,4$).

In den Proben A', B', C', D' und E' 0,2 ccm Toluol + 0 bzw. 0,25, 0,50, 0,75 und 1,00 ccm Phosphatlösung (0,67 mol., $p_H = 6,4$). Reaktionstemperatur 30°.

Um das intakte Zymasystem vollständig zum Typ des strukturlosen abzubauen, sind Eingriffe ganz anderer Art nötig. Schon bei einem frühen Stadium der Untersuchung wußten wir, daß eine Autolyse der Hefe zu einer Veränderung des Zymasystems der hier gemeinten Art führt. Im Hinblick darauf, daß die Vorgänge bei der Autolyse schon an sich ziemlich dunkel sind, war aber diese Tatsache nicht besonders aufschlußreich. Was den Ausgangspunkt für die weiteren Untersuchungen gab, war die Beobachtung, daß ein Zusatz von Toluol zur Gärmischung eine solche Veränderung des Gärverlaufs in dem intakten Zymasystem herbeiführt, daß dieser sich dem in einem Macerations-saft vorkommenden sehr nähert (Abb. 4).

Was am meisten auffällt, ist, daß der Einfluß des Phosphats auf den Gärverlauf durch den Zusatz von Toluol sozusagen invertiert wird. Nachdem das Phosphat ursprünglich eine hemmende Wirkung auf die spätere Gärungsphase gehabt hat, erhält es nach Toluolzusatz eine beschleunigende Wirkung auf die erste Phase der Gärung, deren Ausmaß wie in dem strukturlosen Zymasystem innerhalb gewisser Grenzen eine unmittelbare Funktion der zugesetzten Menge freien Phosphats sein wird.

Es ist aber sehr wesentlich, daß der Toluolzusatz keineswegs eine Inaktivierung der klassischen Zymase mit sich geführt hat. Die Gärgeschwindigkeit während der ersten Gärungsphase, der sogenannten Veresterungsphase, und damit also auch die maximale Gärgeschwindigkeit wird nicht beeinflusst. Unter dem Einfluß von Toluol wird ja, wie wir sehen, während der ersten Gärungsphase eine Gärgeschwindigkeit erreicht, die ebenso groß ist wie die optimale Gärgeschwindigkeit in der intakten Trockenhefe. Wie wir besonders festgestellt haben, hat ein Zusatz von Toluol, wenn es sich um ein strukturloses Zymasystem, wie ein Macerationssaft, handelt, überhaupt keinen Einfluß auf den Verlauf der Gärkurve. Was der Toluolzusatz zur Gärmischung bewirkt, ist, daß er die Fähigkeit des Zymasystems der intakten Trockenhefe auslöscht, den Gärungsprozeß gerade in der Weise durchzuführen, wie es die lebende Zelle tut. Hierdurch wird also nicht die erste Gärungsphase, die sich während der sogenannten Veresterungsperiode abspielt, beeinflusst. Die zweite Gärungsphase dagegen, die ja für die *vollständige* Vergärung des Zuckers ebenso wichtig ist, wird so gut wie ganz ausgeschaltet. Unter sonst optimalen Gärungsbedingungen kann nach Toluolzusatz nur die Hälfte des zugesetzten Zuckers zu Alkohol und Kohlensäure rasch vergoren werden.

Bei unseren Untersuchungen über das Zymasystem der intakten Trockenhefe sind wir mehr und mehr in der Auffassung bestärkt worden, daß der durchgreifende Einfluß von Toluol sowie auch von anderen Eingriffen, auf die wir später zurückkommen, kaum auf einer Zerstörung von Wirkstoffen beruhen kann, die in der lebenden Zelle als Bestandteile des Zymasekomplexes funktionieren. Es scheint uns, als ob es sich eher um eine Aufhebung der Organisierung der verschiedenen Wirkstoffe des Zymasekomplexes handelt, einer Organisierung, die in irgendeiner Weise mit der intakten Zellstruktur zusammenhängt. Nach dieser Auffassung sollte diese Organisierung als eine Art Regulator des Gleichgewichts zwischen den verschiedenen Teilreaktionen bei der Gärung wirken und somit eine Voraussetzung für den harmonischen Gärverlauf in der lebenden Zelle sein.

Wenn wir nun diese Vorstellung annehmen, muß man sich wohl ferner denken, daß für die Aufrechterhaltung dieser Organisierung in

der Zelle gewisse bestimmten Stoffe oder Stoffgruppen verantwortlich sind. Die Kenntnis über diese Stoffgruppen und deren regulatorische Funktionen dürfte die größte Bedeutung für das Verständnis des Mechanismus bei dem harmonischen Gärverlauf in der lebenden Zelle und daran anknüpfend für die Zellphysiologie überhaupt haben.

Um einen Einblick in die chemische Natur dieser Stoffgruppen erhalten zu können, haben wir jetzt Eingriffe von solcher Art unter-

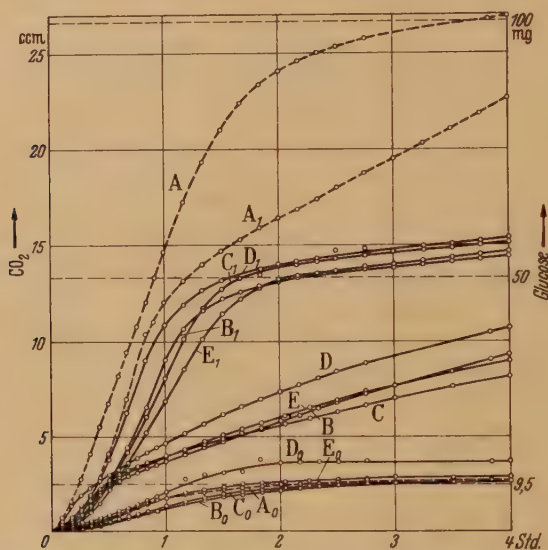


Abb. 5. Einwirkung von organischen Lösungsmitteln auf den Gärverlauf in der intakten Trockenhefe. Zu jeder Gärungsprobe (Gesamt volumen 2 ccm): 200 mg intakte Trockenhefe + 1 Tropfen 2,5 %ige Acetaldehydlösung. Die sonstigen Zusätze gehen aus der folgenden Übersicht hervor.

Zusatz von organischen Lösungsmitteln (je 0,2 ccm)	Gärungsmischungen		
	Selbst- gärungsproben	Proben mit 100 mg Glucose	Proben mit 100 mg Glucose + Phosphat äquivalent mit 100 mg Glucose
Toluol	A ₀	A	A ₁
Benzol	B ₀	B	B ₁
Tetrachlorkohlenstoff	C ₀	C	C ₁
Octylalkohol	D ₀	D	D ₁
	E ₀	E	E ₁

Die Gärkurven ohne Zusatz von organischen Lösungsmitteln gestrichelt. Gärtemperatur 30°.

nommen, daß sie ohne die klassische, freie Zymase zu beeinflussen, zu einer durchgreifenden Desorganisierung des Zymasystems der intakten Trockenhefe führten. Diese Versuche wurden also in der Hoffnung ausgeführt, daß die Art der vorgenommenen Eingriffe gewisse Schlußfolgerungen betreffend die chemische Natur der für das intakte Zymase-

system wesentlichen Substanzen erlauben würden, die durch den fraglichen Eingriff außer Spiel gesetzt wurden.

Ausgehend von dem soeben beschriebenen Toluoleffekt wurde zuerst die Wirkung einer Reihe organischer Lösungsmittel untersucht (Abb. 5).

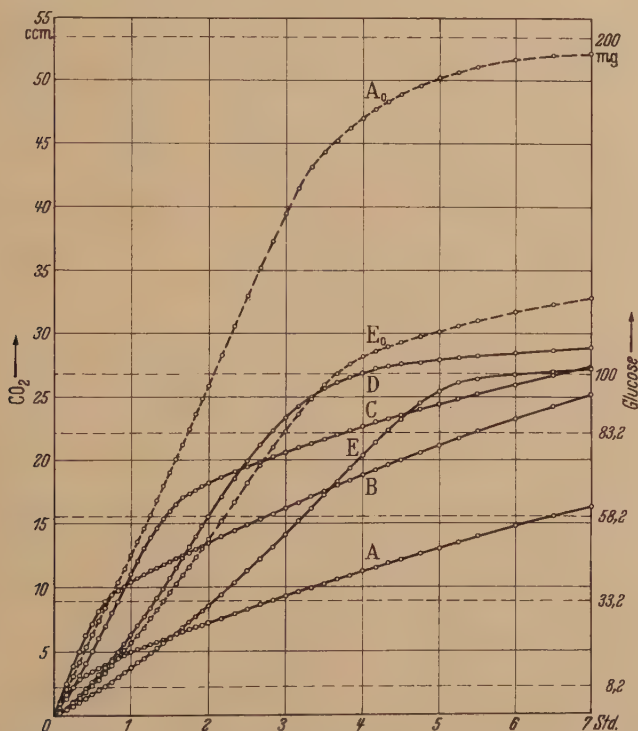


Abb. 6. Einwirkung von Alkohol auf den Gärverlauf in der intakten Trockenhefe bei verschiedenen Phosphatmengen in der Gärungsmischung.

Zu jeder Gärungsprobe (Gesamtvolumen 2 cem): 200 mg intakte Trockenhefe + 200 mg Glucose + 0,1 cem Zymophosphatlösung + 1 Tropfen 2,5 %ige Acetaldehydlösung.

Außerdem zu Probe:

A₀ und A —

B Phosphat äquivalent mit 50 mg Glucose

C „ „ „ 100 „ „

D „ „ „ 150 „ „

E₀ und E „ „ „ 200 „ „

Die Proben A—E enthalten dazu noch 0,2 cem 95,5 %igen Äthylalkohol.

Aus dem Phosphatgehalt der Gärungsmischungen berechnet sich nach *Hardens* Gleichung die Lage des Knickpunktes in den Gärungsproben A bis E zu 8,2 bzw. 33,2, 58,2, 83,2 und 100 mg vergorene Glucose oder 2,2 bzw. 8,9, 15,6, 22,2 und 26,7 cem entwickelte CO₂.

Die Gärkurven A₀ und E₀ ohne Zusatz von Alkohol gestrichelt. Gärtemperatur 30°.

Wie wir sehen, haben alle untersuchten Lösungsmittel grundsätzlich die gleiche Wirkung wie Toluol. Sämtliche hier untersuchten Lösungsmittel können als wasserunlösliche Lipoidlösungsmittel bezeichnet werden. Wir haben auch die Wirkung von wasserlöslichen

Lipoidlösungsmitteln wie Alkohol und Aceton untersucht. Deren Wirkung ist grundsätzlich die gleiche, mit dem kleinen Unterschied vielleicht, daß die desorganisierende Wirkung hier noch schärfer hervortritt, was wohl wahrscheinlich auf dem intimeren Kontakt beruht, der in diesem Falle zwischen der Hefe und dem Lösungsmittel erreicht wird. Im folgenden gebe ich einen Desorganisationsversuch mit Alkohol wieder, der unter etwas anders gewählten Versuchsbedingungen ausgeführt wurde als die Versuche in Abb. 5, und der deswegen in einigen Beziehungen noch weitere Aufschlüsse zu geben vermag (Abb. 6).

Abb. 6 zeigt den Einfluß von Alkohol auf den Gärverlauf in einer intakten Trockenhefe bei verschiedenen Mengen an freiem Phosphat in der Gärmischung. Die gestrichelten Ordinaten geben die Knickpunkte an, die sich nach *Hardens* Gleichung aus der Menge freien Phosphats (einschließlich den Eigengehalt der Trockenhefe an freiem Phosphat) in der Gärmischung berechnen lassen. Diese stimmen also mit den Knickpunkten überein, die bei den in Frage stehenden Phosphatkonzentrationen in einem Macerationssaft auftreten würden.

Wie wir sehen, geht der Verlauf der Gärkurve unter dem Einfluß von Alkohol vollständig in den Typ über, der für das strukturlose Zymasesystem charakteristisch ist. Noch ein Umstand verdient hier beachtet zu werden. In bezug auf den Einfluß dieser verschiedenen Lipoidlösungsmittel könnte noch der Einwand erhoben werden, daß es sich vielleicht doch um eine wirkliche Vergiftung der klassischen Zymase handelt, eine Vergiftung, die in Gärmischungen mit Zusatz von freiem Phosphat auf Grund einer vom Phosphat ausgeübten Schutzwirkung ausbleibt. Der Versuch mit wechselndem Phosphatzusatz zeigt aber eindeutig, daß ein solcher Verdacht nicht berechtigt ist, sondern daß es sich hier zweifellos um eine durchgreifende Veränderung des intakten Zymasesystems handelt, ohne daß dabei die klassische Zymase nennenswert beeinflusst wird. Solche Versuche mit wechselndem Phosphatzusatz haben wir durchgehend verwendet, um sicher festzustellen, daß hinter dem desorganisierenden Einfluß von irgendeinem untersuchten Stoff sich nicht etwa eine wirkliche Zymasevergiftung versteckt. (Vgl. hierzu den entsprechenden Versuch mit Taurocholsäure, Abb. 9, wo sämtliche Phosphatkonzentrationen auch ohne Zusatz von Taurocholsäure studiert wurden.)

Als es sich nun also gezeigt hatte, daß sämtliche untersuchte Lipoidlösungsmittel in ein und derselben Weise eine typische Desorganisation des Zymasesystems der intakten Trockenhefe hervorrufen, dürfte dies wohl als eine erste Andeutung dafür gelten können, daß Stoffe von lipoidartiger Natur irgendeine Funktion bei der Organisation

des Zymasystems der intakten Hefezelle ausüben. Nun ist ja der Begriff „Lipoide“ chemisch ziemlich unbestimmt definiert, doch haben wir uns trotzdem bis auf weiteres damit begnügt, weitere Stützen dafür zu suchen, daß die Stoffgruppen, um die es sich hier handelt, nach landläufiger Auffassung zu den Lipoiden gehören. Wir haben dabei unter anderem an die bemerkenswerte Eigenschaft der Gallensäuren gedacht, sonst wasserunlösliche Stoffgruppen wie Fettsäuren, Sterine und Lecithine in wässrige Lösung zu bringen. Dieser Vorgang, der auf einer Bildung der entsprechenden Choleinsäuren beruht, kann sowohl von den freien als auch von den gepaarten Gallensäuren bewirkt werden. Wir haben daher den Einfluß auf das Zymasystem der

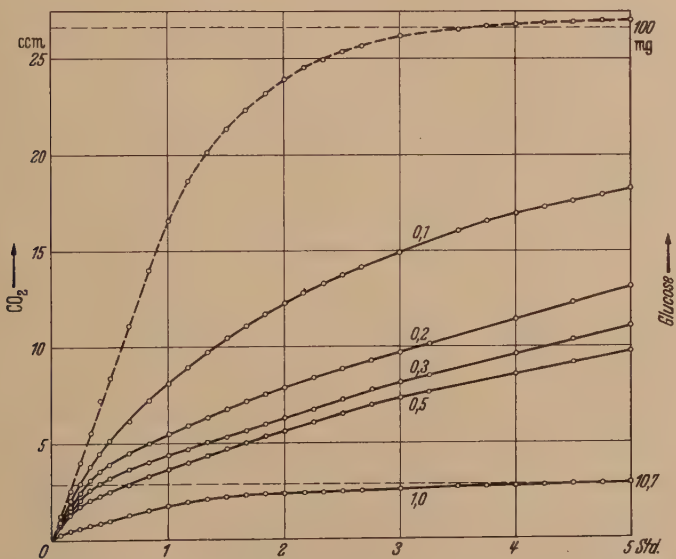


Abb. 7. Einwirkung von Desoxycholsäure auf den Gärverlauf in der intakten Trockenhefe ohne Zusatz von Phosphat.

Zu jeder Gärungsprobe (Gesamtvolumen 2 ccm): 200 mg intakte Trockenhefe + 100 mg Glucose + 0,1 ccm Zymophosphatlösung + 1 Tropfen 2,5 %ige Acetaldehydlösung.

Die Konzentration in der Gärmischung von desoxycholsaurem Na ist bei jeder Kurve in % angegeben. Die Gärkurve ohne Zusatz von desoxycholsaurem Na gestrichelt. Gärtemperatur 30°.

intakten Trockenhefe von teils Desoxycholsäure und teils Taurocholsäure als Vertreter dieser beiden Gallensäuretypen untersucht. Betreffend die Desoxycholsäure haben wir zuerst festgestellt, daß sie den Gärverlauf in einem Macerationssaft nicht beeinflusst, wenn nur nicht sehr hohe Konzentrationen verwendet werden. Der Gärverlauf in der intakten Trockenhefe wird dagegen äußerst stark beeinflusst, und zwar in solcher Weise, daß gesagt werden kann, daß eine reine Desorganisation ohne merkbaren Einfluß auf die freie Zymase vorliegt. Dies

geht sehr deutlich aus Versuchen hervor, die teils ohne Phosphatzusatz (Abb. 7) und teils mit Zusatz einer der Zuckermenge äquivalenten Phosphatmenge ausgeführt wurden (Abb. 8).

In einer Gärmischung ohne Phosphatzusatz ruft die Desoxycholsäure, wie Abb. 7 zeigt, eine sehr starke Hemmung der Gärung hervor. Ganz anders verhält sich eine Gärmischung, die eine der Zuckermenge äquivalente Menge Phosphat enthält (Abb. 8).

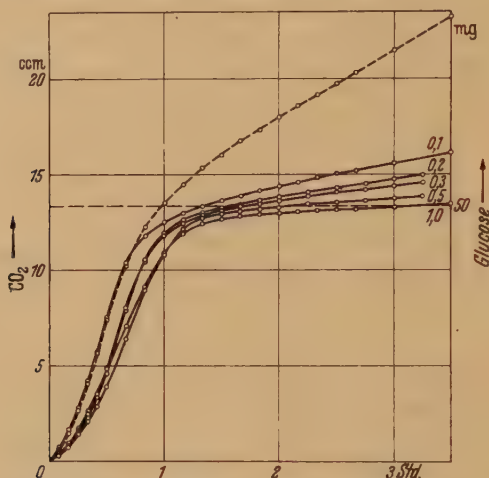


Abb. 8. Einwirkung von Desoxycholsäure auf den Gärverlauf in der intakten Trockenhefe bei Zusatz von Phosphat.

Zu jeder Gärungsprobe (Gesamtvolumen 2 cem): 200 mg intakte Trockenhefe + 100 mg Glucose + Phosphat äquivalent mit 100 mg Glucose + 0,1 cem Zymophosphatlösung + 1 Tropfen 2,5 %ige Acetaldehydlösung.

Die Konzentration in der Gärmischung von desoxycholsaurem Na ist bei jeder Kurve in % angegeben. Die Gärkurve ohne Zusatz von desoxycholsaurem Na gestrichelt.

Gärtemperatur 30°.

Hier wird, bis 50 % des Zuckers vergoren sind, die Gärgeschwindigkeit von Desoxycholsäure, auch in hohen Konzentrationen, praktisch nicht beeinflusst. Die spätere Gärungsphase wird dagegen gehemmt, d. h. die Desoxycholsäure wirkt in einer solchen Weise ein, daß das System den Typ des strukturlosen Zymasystems annimmt.

Auch in diesem Falle haben Versuche mit wechselnden Phosphatmengen uns davon überzeugt, daß es sich nicht um eine wirkliche Zymasevergiftung handelt, die durch Phosphatzusatz aufgehoben werden kann.

Die Versuche mit Taurocholsäure fielen vollständig analog denen mit Desoxycholsäure aus. Ich werde hier den Einfluß von Taurocholsäure auf den Gärverlauf in der intakten Trockenhefe bei wechselndem Gehalt der Gärmischung an Phosphat vorführen (Abb. 9). Vollständig

analoge Verhältnisse herrschen also in den entsprechenden Versuchen mit Desoxycholsäure.

Abb. 9 zeigt in sehr einleuchtender Weise, wie das Zymasystem der intakten Trockenhefe unter dem Einfluß von Taurocholsäure voll-

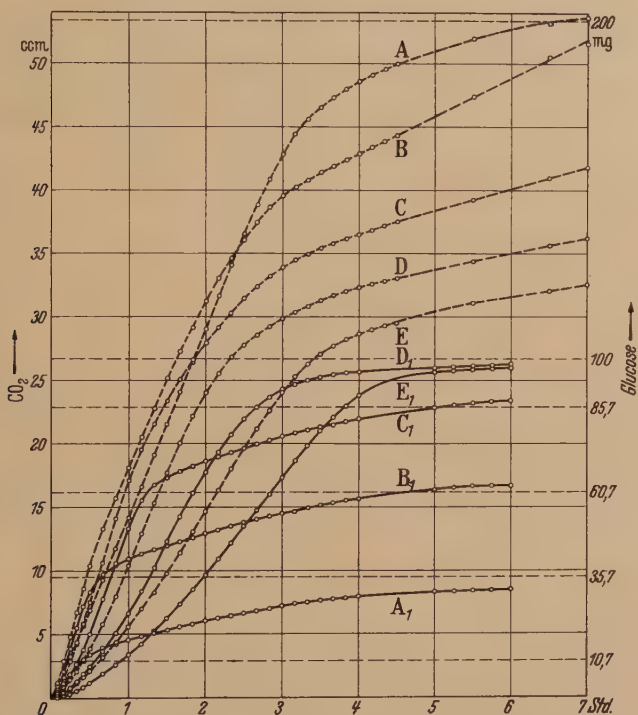


Abb. 9. Einwirkung von Taurocholsäure auf den Gärverlauf in der intakten Trockenhefe bei verschiedenen Phosphatmengen in der Gärungsmischung.

Zu jeder Gärungsprobe (Gesamtvolumen 2 ccm): 200 mg intakte Trockenhefe + 200 mg Glucose + 0,1 ccm Zymophosphatlösung + 1 Tropfen 2,5 %ige Acetaldehydlösung.

Außerdem zu Probe: A und A₁ —;

B „ B₁ Phosphat äquivalent mit 50 mg Glucose;

C „ C₁ „ „ „ 100 „ „

D „ D₁ „ „ „ 150 „ „

E „ E₁ „ „ „ 200 „ „

Die Proben A₁ bis E₁ enthalten dazu noch 0,5 % taurocholsaures Na.

Aus dem Phosphatgehalt der Gärungsmischungen berechnet sich nach *Hardens* Gleichung die Lage des Knickpunktes in den Gärungsproben A₁ bis E₁ zu 10,7 bzw. 35,7, 60,7, 85,7 und 100 mg vergorene Glucose oder 2,9 bzw. 9,5, 16,2, 22,9 und 26,7 ccm entwickelte CO₂.

Die Gärkurven ohne Zusatz von taurocholsaurem Na gestrichelt. Gärtemperatur 30°.

ständig in den Typ der strukturlosen Zymase übergeht. Der Gärverlauf in der intakten Trockenhefe nach Zusatz von Taurocholsäure stimmt vollkommen mit dem Gärverlauf in einem Macerationssaft überein.

In diesem Zusammenhang war es interessant, auch den Einfluß von Saponinen auf das intakte Zymasystem zu untersuchen. Die

Saponine reagieren bekanntlich chemisch bzw. kolloidchemisch auf verschiedene Weise mit Lipiden. Sie wirken z. B. emulgierend auf Fette, geben weiter Additionsverbindungen mit unveresterten Sterinen und können schließlich Lecithinemulsionen klären.

Es zeigte sich, daß z. B. Digitonin auf den Gärverlauf in der intakten Trockenhefe grundsätzlich in der gleichen Weise wie die früher beschriebenen Lipidlösungsmittel oder Gallensäuren einwirkt. Die Wirkung von Digitonin sowie diejenige anderer Saponinpräparate ist

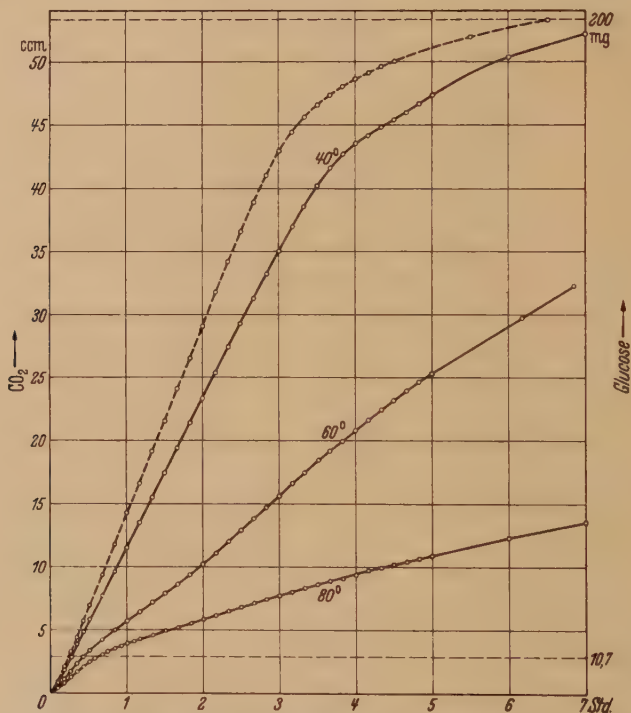


Abb. 10. Einwirkung von Hitzevorbehandlung der intakten Trockenhefe auf den Gärverlauf. Der Knickpunkt in Gärmischungen ohne Phosphatzusatz.

Aus dem Phosphatgehalt der Trockenhefe berechnet sich nach *Hardens* Gleichung die Lage des Knickpunktes zu 10,7 mg vergorene Glucose = 2,9 ccm entwickelte CO₂.

aber bedeutend weniger scharf ausgeprägt als z. B. die Wirkung von Desoxycholsäure.

Die Versuche, über die ich hier berichtet habe, machen es wohl wahrscheinlich, daß die stark desorganisierende Wirkung der untersuchten Stoffe eher mit einer Art Lösungsvorgang als mit irgendeiner durchgreifenden chemischen Veränderung der regulatorisch wirkenden Substanzen zusammenhängt. Es scheint deswegen möglich zu sein,

daß schon eine Veränderung des Aggregatzustandes dieser Substanzen eine Desorganisierung des intakten Zymasystems würde herbeiführen können. Um eine solche Veränderung hervorzurufen, haben wir zu einem sehr einfachen Mittel gegriffen, nämlich Erhitzung der intakten Trockenhefe in trockenem Zustande. Die Trockenhefe wurde in offenen Gefäßen bei 40° bzw. 60° und 80° während 24 Stunden erhitzt. Danach wurde die Gärkurve in Gärmischungen von wechselndem Phosphatgehalt aufgenommen. Abb. 10 zeigt die Wirkung der Erhitzung, wenn die Gärmischung kein extra zugesetztes Phosphat enthält.

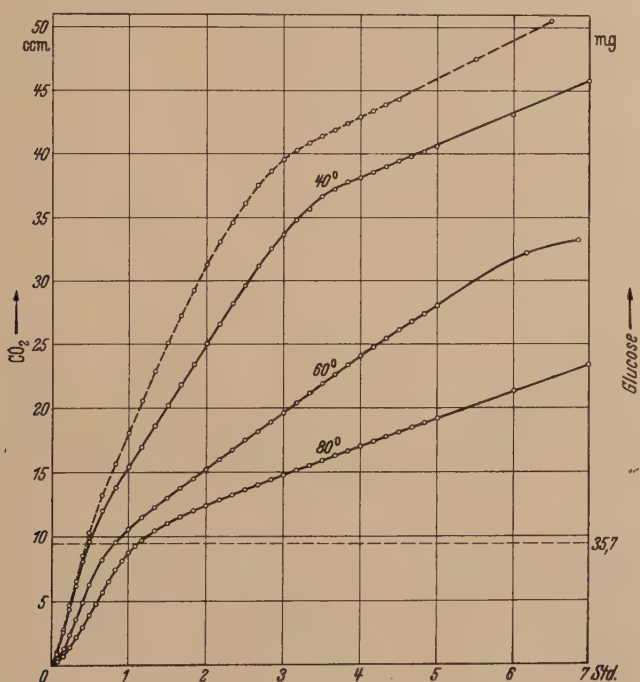


Abb. 11. Einwirkung von Hitzevorbehandlung der intakten Trockenhefe auf den Gärverlauf. Der Knickpunkt in Gärmischungen mit Zusatz von Phosphat äquivalent mit 50 mg Glucose.

Die Lage des Knickpunktes berechnet sich nach *Hardens* Gleichung zu 35,7 mg vergorene Glucose = 9,5 ccm entwickelte CO₂.

Wie wir sehen, führt die Erhitzung zu einer starken Herabsetzung der Gärgeschwindigkeit bei dieser Anordnung des Gärversuchs. Die Gärung teilt sich deutlich in zwei Phasen auf, und der dadurch hervorgerufene Knickpunkt auf der Gärkurve liegt, wo er liegen müßte, wenn man ihn nach *Hardens* Gleichung aus dem Phosphatgehalt der Trockenhefe berechnet.

Bei Zusatz von Phosphat zur Gärmischung erhält die erste, raschere Gärungsphase eine größere Ausdehnung, und ihr Ausmaß steht, wie

man aus Abb. 11, 12 und 13 entnehmen kann, mit der Forderung von *Hardens* Gleichung in guter Übereinstimmung.

Ein Vergleich von Abb. 10 mit Abb. 13 läßt erkennen, daß die starke Herabsetzung der Gärgeschwindigkeit, die infolge der Erhitzung der

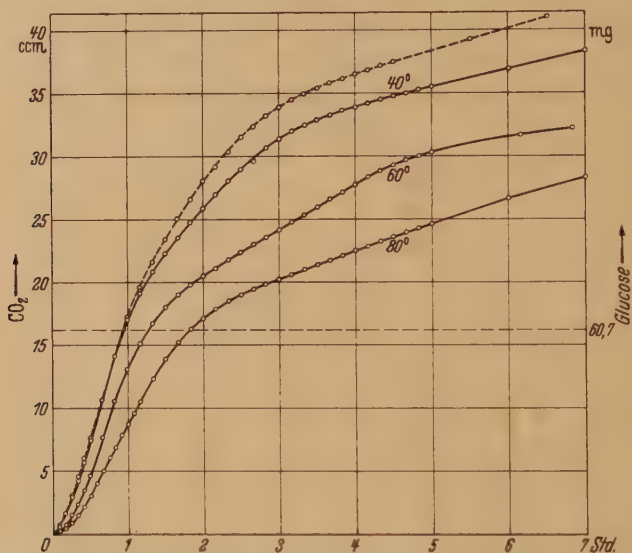


Abb. 12. Einwirkung von Hitzevorbehandlung der intakten Trockenhefe auf den Gärverlauf. Der Knickpunkt in Gärmischungen mit Zusatz von Phosphat äquivalent mit 100 mg Glucose.

Die Lage des Knickpunktes berechnet sich nach *Hardens* Gleichung zu 60,7 mg vergorene Glucose = 16,2 ccm entwickelte CO_2 .

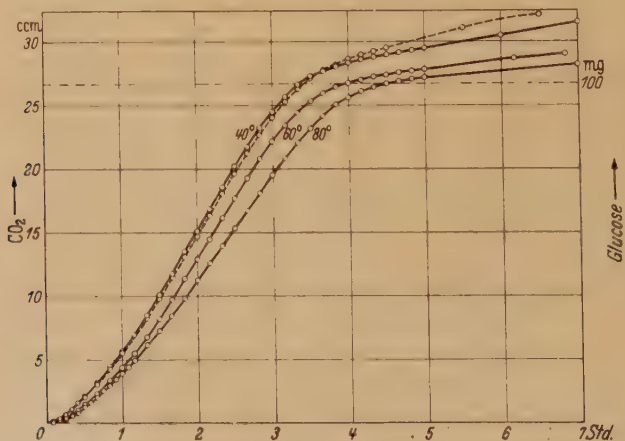


Abb. 13. Einwirkung von Hitzevorbehandlung der intakten Trockenhefe auf den Gärverlauf. Der Knickpunkt in Gärmischungen mit Zusatz von Phosphat äquivalent mit 200 mg Glucose.

Die Lage des Knickpunktes berechnet sich nach *Hardens* Gleichung zu 100 mg vergorene Glucose = 26,7 ccm entwickelte CO_2 .

Trockenhefe in Gärmischungen ohne Phosphatzusatz zum Vorschein kommt, praktisch ganz ausbleibt, wenn die Gärmischung eine mit der Zuckermenge äquivalente Menge Phosphat enthält. Man kann also sagen, daß die Erhitzung der intakten Trockenhefe eine Desorganisierung ihres Zymasystems hervorgerufen hat, die grundsätzlich von der gleichen Art ist wie diejenige, die unter dem Einfluß von Lipoidlösungsmitteln, Gallensäuren oder Saponinen eintritt. In diesem Falle kann es sich ja nicht um eine chemische Reaktion mit einem zugesetzten Stoff handeln, und es erscheint wahrscheinlich, daß die Desorganisierung durch eine Zustandsänderung physikalischer Art, z. B. einen Schmelzprozeß oder irgendeine kolloidchemische Veränderung, hervorgerufen worden ist.

Wir können jetzt also feststellen, daß man das organisierte Zymasystem der intakten Trockenhefe in den Typ der strukturlosen Zymase durch folgende Eingriffe überführen kann.

1. Erhitzung der intakten Trockenhefe in trockenem Zustande.
2. Zusatz von organischen Lösungsmitteln (Lipoidlösungsmitteln) zu der Gärmischung.
3. Zusatz von Gallensäuren zu der Gärmischung.
4. Zusatz von Saponinen zu der Gärmischung.

Wir wissen außerdem, daß eine Autolyse der Hefe zu einer entsprechenden Veränderung des intakten Zymasystems führt. In letzterem Falle ist es von Interesse, daß die Zymase gleichzeitig damit, daß sie während der Autolyse desorganisiert wird, auch in homogene, wässrige Lösung übergeht.

Man fragt sich vielleicht jetzt, ob es möglicherweise so sein könnte, daß jeder Eingriff, der überhaupt den Verlauf der Gärung in der intakten Trockenhefe beeinflusst, auch eine Desorganisierung ihres Zymasystems hervorruft. Dies ist aber keineswegs der Fall. Man kann nämlich auf viele verschiedene Weisen eine *Inaktivierung der klassischen Zymase* hervorrufen, die zu keiner Desorganisierung des intakten Zymasystems führt, und die deswegen auch den Gärverlauf in ähnlicher Weise beeinflusst, unabhängig davon, ob die Gärmischung einen Zusatz von freiem Phosphat erhalten hat oder nicht. Dies ist z. B. der Fall bei Vergiftungen mit typischen Zymasegiften wie NaF, weiter bei der Gärungshemmung durch hohe Neutralsalzkonzentrationen, bei Einfluß von Glycerin usw. Als typischen Gegensatz zu den Desorganisationsversuchen werde ich jetzt den Einfluß von Glycerin auf den Gärverlauf in der intakten Trockenhefe bei Gärmischungen mit und ohne Zusatz von Phosphat zeigen (Abb. 14).

Wir kehren nun einen Augenblick zu unserer Vorstellung über die Organisierung des intakten Zymasystems zurück. In der lebenden

Hefezelle wird durch die regulatorisch wirkenden Stoffgruppen ein harmonisches Gleichgewicht zwischen den verschiedenen Biofaktoren bzw. den von diesen katalysierten intermediären Reaktionen aufrecht-erhalten. In dem strukturlosen Macerationssaft, wo die freigewordenen Biofaktoren ohne diese Regulierung wirksam sind, kann zwar eine maximale Gärgeschwindigkeit erreicht werden, die in keiner Beziehung

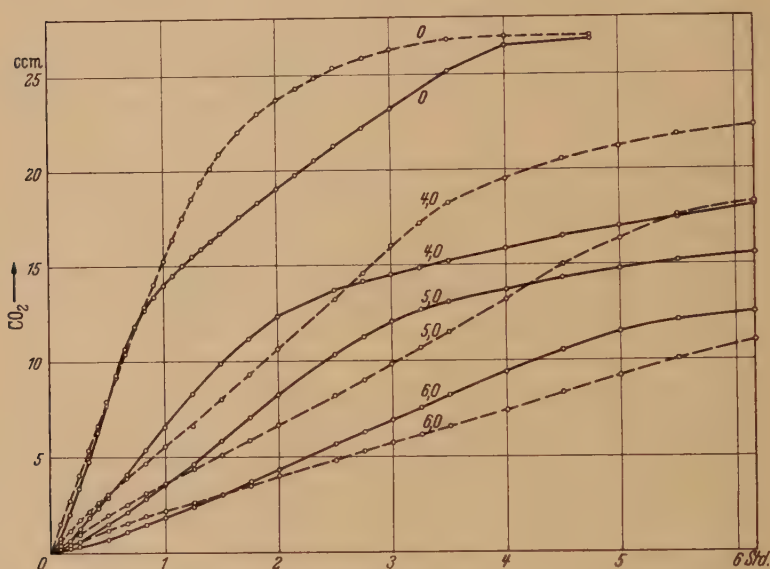


Abb. 14. Einwirkung von Glycerin auf den Gärverlauf in der intakten Trockenhefe.

Zu jeder Gärungsprobe (Gesamt volumen 2 cm): 200 mg intakte Trockenhefe + 100 mg Glucose + 0,1 cm Zymophosphatlösung + 1 Tropfen 2,5%ige Acetaldehydlösung.

Die Gärungen wurden teils ohne (gestrichelte Kurven) und teils mit (ausgezogene Kurven) Zusatz von Phosphat (äquivalent mit 100 mg Glucose) angesetzt.

Die molare Konzentration in der Gärmischung von Glycerin ist bei jeder Kurve angegeben. Gärtemperatur 30°.

hinter derjenigen der lebenden Zelle zurücksteht. Der Gärungsprozeß verläuft aber nicht mehr harmonisch, da hier der Zucker nur zum Teil zu Alkohol und Kohlensäure vergoren werden kann. Auch unter sonst optimalen Bedingungen bleibt mindestens die Hälfte des Zuckers als Schlacke, d. h. in unvergärbbarer Form, zurück. Der gleiche Zustand tritt bei der intakten Trockenhefe nach Desorganisierung mit den Mitteln ein, die wir eben beschrieben haben. Durch die desorganisierenden Eingriffe werden die regulatorisch wirkenden Stoffgruppen ausgeschaltet. Aus der Art des desorganisierenden Eingriffs Schlußfolgerungen auf die Natur der dadurch beeinflussten Substanz zu ziehen, ist natürlich eine sehr schwierige Aufgabe, dies schon in dem Falle, daß

an der Organisierung nur *eine* regulatorisch wirkende Substanz teilnahme. Es ist natürlich auch möglich, daß mit verschiedenen, regulatorisch wirkenden Stoffen gerechnet werden muß, wobei vielleicht eine Veränderung, gleichgültig welcher dieser Stoffe, zu einer vollständigen Desorganisierung des Zymasystems führen könnte.

Unsere bisherigen Untersuchungen scheinen in gewissem Maße die Annahme zu unterstützen, daß die Substanz oder die Substanzen, um die es sich hier handelt, zu der Gruppe der sogenannten Lipide gehören. Der Verdacht, daß dies der Fall ist, gründet sich auf unsere Erfahrung, daß die Desorganisierung des Zymasystems allem Anschein nach regelmäßig nach jedem Eingriff auftritt, der in erster Linie eine Zustandsänderung der Stoffe von Lipoidnatur bezweckt. Die Schlußfolgerung ist natürlich keineswegs bindend. Es *könnte* sich ja auch um irgendeine Substanz anderer Art handeln, die auf Lipoidreagentien reagiert. So läßt es sich z. B. sehr wohl denken, daß irgendeiner von den Biofaktoren der klassischen Zymase in der lebenden Zelle sowohl als auch in der intakten Trockenhefe an eine Art „Träger“ gebunden sein könnte, und daß sich diese Bindung schon durch ziemlich milde Eingriffe lösen ließe. Also ein Zustand sehr ähnlich dem, der bei gewissen Farbstoffen vorkommt, die an Eiweiß gebunden sind, und bei denen die Eiweißkomponente einfach durch Behandlung mit Alkohol abgesprengt werden kann. Man kann in diesem Zusammenhang ferner an die labile Kupplung zwischen einem Hapten und seinem „Schlepper“ denken.

Sollte es sich tatsächlich so verhalten, würde die Organisierung in diesem Träger sitzen, und man könnte sich dann vorstellen, daß sich das intakte Zymasystem in homogener Lösung realisieren lassen würde, wobei keine Forderung an eine Struktur überhaupt erhoben zu werden brauchte.

Es kann aber interessant sein zu untersuchen, ob die uns besonders verdächtigen Lipide irgendwelche Eigenschaften besitzen, die sie besonders geeignet machen könnten, als Regulatoren des Gleichgewichts zwischen den verschiedenen Intermediärreaktionen bei der alkoholischen Gärung zu funktionieren.

Nun haben ja besonders einige Eigenschaften der Phosphatide die Zellphysiologen interessiert, als es sich darum handelte, die mit der Zellpermeabilität zusammenhängenden Probleme zu erklären. Dabei ist u. a. ihre Fähigkeit, in Wasser zu quellen, ferner die elektrischen Ladungsverhältnisse der Phosphatid-(Lecithin-)Teilchen und schließlich ihre Eigenschaft, auf Wasser monomolekulare Schichten zu bilden, zu erwähnen.

*Leathes*¹ entwickelt die Vorstellung, daß solche Lecithinschichten in der Zelle an der Zellmembran vorkommen und auch den Zellinhalt durchkreuzen. Er nimmt an, daß diese Lecithinschichten eine besondere Bedeutung für die Permeabilität der Zelle besitzen.

Interessant ist weiter die Fähigkeit der Lipoide, als negative Katalysatoren zu wirken. Diese Eigenschaft besitzt in erster Linie das Lecithin, während sie bei Neutralfetten weniger ausgeprägt ist und bei Cholesterin vollkommen fehlt. *Siegfried*² spricht die Vermutung aus,

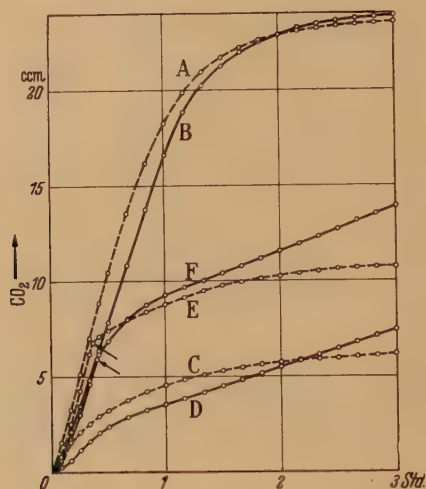


Abb. 15. Einwirkung von Toluol auf den Gärverlauf in lebender Hefe.

Zu jeder Gärungsprobe (Gesamtvolumen 2 cem): 74 mg (Trockengewicht bei 105°) frischer untergäriger Bierhefe + 100 mg Glucose + 0,1 cem Zymophosphatlösung + 1 Tropfen 2,5 %ige Acetaldehydlösung.

Außerdem zur Probe:

A —;

B Phosphat äquivalent mit 100 mg Glucose;

C und E 0,2 cem Toluol;

D und F Phosphat äquivalent mit 100 mg Glucose + 0,2 cem Toluol.

Die Proben C und D enthalten schon von Anfang an Toluol. Zu den Proben E und F wird Toluol bei einem Zeitpunkt zugesetzt, der in der Abbildung durch einen Pfeil bezeichnet ist.

Gestrichelte Kurven = Proben ohne Phosphatzusatz. Ausgezogene Kurven = Proben mit Phosphatzusatz.

Gärtemperatur 30°.

daß die prämortale Erhöhung des Eiweißbaues und des Zellenzerfalls, die man bei Hungertieren nach Verbrauch der Hauptmenge des Depotfettes feststellen kann, damit zusammenhängt, daß die Eiweißspaltung in der lebenden Zelle durch die Zellipoide gehemmt wird, und daß diese Hemmung in dem Maße wegfällt, wie die Zellipoide verbraucht

¹ J. B. Leathes, J. of gen. Physiol. 58, Proc. VI, 1923; Lancet 1925, S. 803, 853, 957, 1019. — ² M. Siegfried, Biochem. Zeitschr. 86, 98, 1918.

werden. In diesem Zusammenhang kann vielleicht daran erinnert werden, daß während der Autolyse der Hefezelle die Organisation des intakten Zymasystems verlorengeht, gleichzeitig damit, daß die Zymase ihre Bindung an die Zellstruktur aufgibt und in wasserlösliche Form übergeht, ohne daß dadurch die Aktivität der klassischen Zymase wesentlich herabgesetzt wird.

Noch eine Frage muß schließlich behandelt werden. Durch die oben beschriebenen Eingriffe wird in sehr klarer und überzeugender Weise eine vollständige Desorganisation des Zymasystems der intakten Trockenhefe zustandegebracht. Beim Arbeiten mit lebenden Hefezellen sind aber die Verhältnisse bedeutend schwieriger zu überblicken. Zwar kann man feststellen, daß nach einem Eingriff, der nach unserer Erfahrung aus den Versuchen mit intakter Trockenhefe desorganisierend wirken müßte, ein Zusatz von Phosphat auch in einem solchen System die Gärgeschwindigkeit beschleunigt. Eine vollständige Differenzierung der Gärkurve wird aber nicht erhalten (Abb. 15).

Offenbar muß man in der Hefezelle mit zwei deutlich verschiedenartigen Zustandsänderungen rechnen, die streng auseinanderzuhalten sind. Die Beseitigung der Permeabilitätsschwierigkeiten, die durch die schnelle Trocknung der Hefe zustande gebracht wird, hat keinen Einfluß auf die Organisation des Zymasystems, die in der intakten Hefezelle herrscht. Diese Beseitigung der Permeabilitätshindernisse ist aber eine notwendige Voraussetzung dafür, daß die Desorganisation demonstriert werden kann. In diesem Zusammenhang ist es interessant, daß *Lundegårdh*¹ auf Grund der Ladungsverhältnisse in der Plasmamembran² zu der Auffassung gelangt, daß diese selbst keine Phosphatide enthält, wenigstens nicht in höherem Grade. Mit dieser Auffassung als Hintergrund erscheint es sehr begreiflich, daß die schnelle Trocknung der Hefezelle zu einer Erhöhung der Permeabilität der Zellmembran führen kann, ohne daß dabei eine Desorganisation des intakten Zymasystems auftritt.

Zuletzt erscheint in einem wichtigen Punkt eine Verdeutlichung angebracht. Wir haben im vorhergehenden gesehen, daß dem strukturellen Zymasystem ein Prinzip fehlt, das in dem strukturgebundenen eine regelnde Funktion auf das Zusammenspiel der verschiedenen Teilreaktionen ausübt, die in den Gärungsmechanismus eingehen. Hiermit ist natürlich nicht gesagt, daß die Bedeutung der Struktur für diese Organisation streng morphologisch aufgefaßt werden muß, was ja auch aus der vorliegenden Darstellung hervorgegangen sein

¹ *H. Lundegårdh*, Ann. d. Landwirtschaftl. Hochschule Schwedens 8, 233, 1940. — ² Diese Messungen sind allerdings an pflanzlichem Material ausgeführt worden.

dürfte. Es kann sehr wohl der Fall sein, daß die Strukturelemente, die für die Organisierung innerhalb der Zelle verantwortlich sind, für ihre Funktionsfähigkeit nicht absolut von einer bestimmten morphologischen Lokalisierung in der Zelle abhängig sind, sondern auch außerhalb der Zelle wirken können. In diesem Falle sollte eine gewisse Möglichkeit bestehen, in einem vollständig strukturlosen Zymasesystem eine Organisierung dadurch aufzubauen, indem man darin die wahrscheinlich unlöslichen Stoffgruppen dispergiert, die innerhalb der Zelle als Regulatoren des intermediären Stoffwechsels funktionieren. Unter Zuhilfenahme der bakteriologischen Mühle sind wir mit Versuchen in dieser Richtung beschäftigt, und es sieht tatsächlich so aus, als ob solche Systeme, die also eine sehr einfache Struktur haben würden, in gärungschemischer Beziehung verglichen mit der vollständig strukturlosen klassischen Zymase sich der lebenden Zelle würden bedeutend nähern können.

12. Band

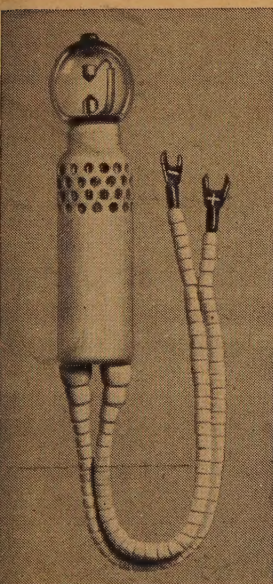
Inhaltsverzeichnis

1. Heft

	Seite
Plotho, O. v. Die Synthese der Knöllchen an den Wurzeln der Erle. Mit 4 Textabbildungen	1
Rennerfelt, E. Das Wachstum einiger Pilze aus Holzschliff bei verschiedenen Temperatur. Mit 4 Textabbildungen	19
Bline, M., und M. Bojec. Fett aus <i>Mucor mucedo</i>	41
Ondratschek, Karl. Über das Wirkstoffbedürfnis heterotropher Algen. II. Mitteilung: Aneurinals Wachstumsfaktor für <i>Polyblepharidineen</i> und weitere <i>Chilomonaden</i>	46
Lindeberg, Gösta. Über die Wirkung von Biotin auf <i>Marasmius androsaceus</i> (L.) Fr. Mit 2 Textabbildungen	58
Sammelbericht:	
Nilsson, Ragnar. Über die Bedeutung der Zellstruktur für den harmonischen Verlauf des Stoffwechsels in der Zelle. Mit 15 Textabbildungen	63

Aufnahmebedingungen siehe 4. Umschlagseite.

OSRAM- Quecksilber - Höchstdrucklampen



liefern höchste technisch erzeugbare **Leucht-** sowie **Strahldichten** im sichtbaren Gebiet und im langwelligem UV.

Die Lampen werden gebaut für Leistungsaufnahmen von 500 W Gleichstrom und 550 W Wechselstrom und 1000 W Gleichstrom, 25000 sb Leuchtdichte, etwa 25 000 bzw. 50 000 Hlm Lichtstrom.

Anwendungsgebiete: Optik, Projektions- und Scheinwerfertechnik, Fluoreszenzuntersuchungen, Mikrophotographie, Kolloidforschung, biologische Untersuchungen usw.

OSRAM

G. m. b. H. Kommanditgesellschaft BERLIN O 17

Aufnahmebedingungen.

I. Sachliche Anforderungen.

1. Der Inhalt der Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören.
2. Die Arbeit muß wissenschaftlich wertvoll sein und Neues bringen. Bloße Bestätigungen bereits anerkannter Befunde können, wenn überhaupt, nur in kürzester Form aufgenommen werden. Das gleiche gilt von Versuchen und Beobachtungen, die ein positives Ergebnis nicht ergeben haben. Arbeiten rein referierenden Inhalts werden abgelehnt, vorläufige Mitteilungen nur ausnahmsweise aufgenommen. Polemiken sind zu vermeiden, kurze Richtigstellung der Tatbestände ist zulässig. Aufsätze spekulativen Inhalts sind nur dann geeignet, wenn sie durch neue Gesichtspunkte die Forschung anregen.

II. Formelle Anforderungen.

1. Das Manuskript muß leicht leserlich geschrieben sein. Die Abbildungsvorlagen sind auf besonderen Blättern einzuliefern. Diktierter Arbeiten bedürfen der stilistischen Durcharbeitung zwecks Vermeidung von weitschweifiger und unsorgfältiger Darstellung. Absätze sind nur zulässig, wenn sie neue Gedankengänge bezeichnen.
2. Die Arbeiten müssen kurz und in gutem Deutsch geschrieben sein. Arbeiten in den anderen Kongreßsprachen können nur aufgenommen werden, wenn es sich um die Muttersprache des Autors handelt. Ausführliche historische Einleitungen sind zu vermeiden. Die Fragestellung kann durch wenige Sätze klargelegt werden. Der Anschluß an frühere Behandlungen des Themas ist durch Hinweis auf die letzten Literaturzusammenstellungen (in Monographien, „Ergebnissen“, Handbüchern) herzustellen.
3. Der Weg, auf dem die Ergebnisse gewonnen wurden, muß klar erkennbar sein; jedoch hat eine ausführliche Darstellung der Methodik nur dann Wert, wenn sie wesentlich Neues enthält.
4. Jeder Arbeit ist eine kurze Zusammenstellung (höchstens eine Seite) der wesentlichen Ergebnisse anzufügen, hingegen können besondere Inhaltsverzeichnisse für einzelne Arbeiten nicht abgedruckt werden.
5. Von jeder Versuchsart bzw. jedem Tatsachenbestand ist in der Regel nur ein Protokoll im Telegrammstil als Beispiel in knappster Form mitzuteilen. Das übrige Beweismaterial kann im Text oder, wenn dies nicht zu umgehen ist, in Tabellenform gebracht werden; dabei müssen aber umfangreiche tabellarische Zusammenstellungen unbedingt vermieden werden ¹⁾.
6. Die Abbildungen sind auf das Notwendigste zu beschränken. Entscheidend für die Frage, ob Bild oder Text, ist im Zweifelsfall die Platzersparnis. Kurze, aber erschöpfende Figurenunterschrift erübrigt nochmalige Beschreibung im Text. Für jede Versuchsart, jedes Präparat ist nur ein gleichartiges Bild, Kurve u. ä. zulässig. Unzulässig ist die doppelte Darstellung in Tabelle und Kurve. Farbige Bilder können nur in seltenen Ausnahmefällen Aufnahme finden, auch wenn sie wichtig sind. Didaktische Gesichtspunkte bleiben hierbei außer Betracht, da die Aufsätze in den Archiven nicht von Anfängern gelesen werden.
7. Literaturangaben, die nur im Text berücksichtigte Arbeiten enthalten dürfen, erfolgen ohne Titel der Arbeit nur mit Band-, Seiten-, Jahreszahl. Titelangabe nur bei Büchern.
8. Die Beschreibung von Methodik, Protokollen und anderen weniger wichtigen Teilen ist für Kleindruck vorzumerken. Die Lesbarkeit des Wesentlichen wird hierdurch gehoben.
9. Das Zerlegen einer Arbeit in mehrere Mitteilungen zwecks Erweckung des Anscheins größerer Kürze ist unzulässig.
10. Doppeltitel sind aus bibliographischen Gründen unerwünscht. Das gilt insbesondere, wenn die Autoren in Ober- und Untertitel einer Arbeit nicht die gleichen sind.
11. An Dissertationen, soweit deren Aufnahme überhaupt zulässig erscheint, werden nach Form und Inhalt dieselben Anforderungen gestellt wie an andere Arbeiten. Danksagungen an Institutsleiter, Dozenten usw. werden nicht abgedruckt. Zulässig hingegen sind einzeilige Fußnoten mit der Mitteilung, wer die Arbeit angeregt und geleitet, oder wer die Mittel dazu gegeben hat. Festschriften, Habilitationsschriften und Monographien gehören nicht in den Rahmen einer Zeitschrift.

¹⁾ Es wird empfohlen, durch eine Fußnote darauf hinzuweisen, in welchem Institut das gesamte Beweismaterial eingesehen oder angefordert werden kann.